

PERFIL IMUNOLÓGICO DE GRÁVIDAS ATÓPICAS
***VERSUS* GRÁVIDAS SAUDÁVEIS**

ANA CATARINA SILVA GREGÓRIO DA COSTA MARTINS
Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Vida
na Especialidade em Imunologia
na Faculdade de Ciências Médicas

Setembro de 2015

**EVOLUÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE GRÁVIDAS ATÓPICAS *VERSUS* GRÁVIDAS
SAUDÁVEIS**

Ana Catarina Silva Gregório da Costa Martins

Orientador: Luís Miguel Borrego, Professor Auxiliar

Co-orientador: Hélder Trindade, Professor Catedrático

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Vida
na Especialidade em Imunologia**

Setembro de 2015

“Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A todas as mulheres que aceitaram participar neste estudo, grávidas e não grávidas, porque pela sua participação foi possível construir este pequeno contributo para uma melhor compreensão das patologias alérgicas.

Porque o caminho se faz com quem caminha ao nosso lado, é com sentido reconhecimento que afirmo que este trabalho não teria sido possível sem o apoio e a presença de várias pessoas, a quem deixo, aqui, o meu agradecimento:

Àqueles que são os pilares da minha existência:

Aos meus pais, António e Piedade, e aos meus irmãos, António, Mariana e Inês... pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos, por serem, desde sempre, o meu colo, o meu porto de abrigo, a minha alegria e quem mais acredita em mim;

Aos meus queridos sobrinhos, Tomás e Leonor, mestres da ternura, por tornarem mais leves os dias, e mais fáceis os sorrisos, a cada abraço;

Ao Pedro, com quem caminho de mão dada, pelo amor que redescobrimos em cada etapa, pela doçura e pelo mimo, por ser a força que me faz avançar, e por tudo o que não cabe em palavras.

Aos meus cunhados, Sameiro, Hugo e António, aos meus sogros, Manuel e Isabel, ao Tiago, à D. Lucília, e à minha restante família, que me acompanharam também nesta travessia, ainda que por vezes à distância, por me fazerem sentir amada e acarinhada, e se fazerem presentes de tantas maneiras;

Aos meus amigos, em particular, à Liliana e à Inês, à Mafalda, à Cristina, ao Marcos, ao Alexandre, à Susana e ao Tiago, e ao Bento e à Sónia, pela cumplicidade, pelos desabafos, pelas gargalhadas, pela presença, nos bons e nos maus momentos.

Ao Professor Luís Miguel Borrego, que acompanhou e orientou este projeto desde o início, pelo incentivo constante, pelos desafios lançados, pela inigualável energia que me renovou tantas vezes a esperança, e pela confiança e exigência que guiaram este caminho, fortalecido ainda mais pelos laços de uma amizade que muito prezo;

Ao Professor Hélder Trindade, que me recebeu no Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, e que confiou no meu trabalho, permitindo-me crescer e progredir no campo da Imunologia, também por impulsionar e orientar este projeto;

À Dr.^a Maria Jorge Arroz, que me trouxe até aos *fluorescentes caminhos* da Citometria de Fluxo e da Imunologia, por ter acreditado em mim e me ter ensinado tanto da sua arte, pela energia positiva que irradia, e pela presença inspiradora e amiga em tantos momentos;

A todos os que entraram comigo nesta aventura, participando diretamente nas atividades desenvolvidas nesta tese, em particular, ao Dr. Jorge Ramos Lima, pela incansável disponibilidade, pelo precioso rigor e colaboração em todas as etapas deste percurso, e pela simpatia com que sempre me acolheu; à Técnica Glória Nunes e à Assistente Administrativa Filomena Jorge, a minha equipa de todos os dias, que deram tanto do seu tempo e do seu trabalho diário para que este projeto pudesse avançar, ganhasse forma e se concretizasse; ao Dr. Tiago Domingues, pelo contributo dado na análise estatística, que fortaleceu os meus conhecimentos nesta área.

À Dr.^a Manuela Santos Monteiro e ao Dr. Paulo Pires, que viram iniciar a minha vida profissional, e me acompanham desde então, como fonte de inspiração, pelo exemplo de profissionalismo, rigor, empenho e entrega, com que encaram a sua atividade, e aos quais tenho a honra e o prazer de chamar amigos;

A todas as pessoas com quem me cruzei no Laboratório Santos Monteiro, no Instituto Português de Acreditação, no Hospital Egas Moniz, na NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas e na Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto, e a todos os meus professores desde a infância, pelas aprendizagens e pelas partilhas, que moldaram também aquilo que sou hoje.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

α -GalCer - α -galactosilceramida

β HCG – Gonadotrofina coriónica humana

μ g – micrograma

μ L - microlitro

μ MT – *μ -chain-deficient mice* / ratinhos com mutação na cadeia μ

AA – Asma atópica

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ahr – *Aryl hydrocarbon receptor*

APC - Aloficocianina

ARIA – *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*

ARLT – Antagonistas dos recetores dos leucotrienos

ARN – Ácido ribonucleico

ARPA – Avaliação da Prevalência e Caracterização da Rinite em Portugal Continental

ASC – Área sob a curva

BAFF – *B cell activating factor* / Fator ativador da célula B

Bcl-6 – *B cell lymphoma 6*

BCR – Recetor de célula B

Breg – Célula B reguladora

CAP - Célula apresentadora de antígeno

CBMC – *Cord blood mononuclear cells* / Células mononucleares do sangue do cordão

CCL – *Chemokine ligand* / *Ligando de quimiocina*

CD – *Cluster of differentiation*

cDC – Célula dendrítica convencional

CG - Centro germinativo

CM – Células T de memória central

CTLA-4 – *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* / Molécula tipo 4 associada a linfócito T citotóxico

CV – coeficiente de variação

CXCR – *Chemokine receptor* / Recetor de quimiocina

Cy - Cianina

DA – Dermatite atópica

DAMPs – *Danger-associated molecular patterns* / Padrões moleculares associados a perigo

DC – Célula dendrítica

DN – duplos negativos

DR5 – *Death receptor 5* / Recetor de morte 5

EAE – *Experimental autoimmune encephalomyelitis* / Encefalomielite autoimune experimental

ECP – Proteína Catiónica Eosinofílica

ECRHS – *European Community Respiratory Health Survey*

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EM – Células T de memória efetoras

FasL – Ligando do Fas

FcεRI – Recetor de alta afinidade de IgE

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL – Fluorescência

FMO - *Fluorescence Minus One*

FO – Células foliculares

Foxp3 – *Forkhead box protein 3*

FSC – *Forward Scatter* / Dispersão frontal

GA – Mulheres grávidas atópicas

GA DA - Mulheres grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência

GA SDA - Mulheres grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência

GATA-3 – *GATA-binding protein 3* / Proteína de ligação a sequência GATA 3

GINA – *Global Initiative for Asthma*

GITR – *Glucocorticoid-induced TNFR family related gene*

GM-CSF – *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* / Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos

GS - Mulheres grávidas saudáveis

GWAS – *Genome-Wide Association Studies*

HLA – *Human leukocyte antigen*/ Antígeno Leucocitário Humano

HSP – *Heat Shock Protein* / Proteína de choque térmico

IC – Intervalo de confiança

ICS – Corticosteroide inalado

ICOS – *Inducible co-stimulator* / Co-estimulador indutível

IDO – *Indoleamine 2,3-dioxygenase* / Indolamina 2,3-dioxigenase

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IL2Rα – Cadeia alfa do recetor da IL2

ILCs – *Innate lymphoid cells* / Células linfoides inatas

INAsma – Inquérito Nacional sobre Asma

iNKT – Células NKT invariantes

IP10 – *IFN-γ-inducible protein of 10kDa*

IRAK 4 – *IL-1 receptor-associated kinase 4*

IRF – *IFN regulatory factor* / Fator regulador de IFN

ISAAC – *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*

IVD – Diagnóstico *in vitro*

LABA – Agonistas beta2 de ação prolongada

Lag3 – *Lymphocyte-activation gene 3*

Lck – *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

LFA – *Leucocyte Function-associated antigen*

LIR – *Leukocyte immunoglobulin-like receptors*

LPS - Lipopolissacárido bacteriano

LTi – *Lymphoid tissue inducer*

mARN – ARN mensageiro

MBP – Proteína Básica Major

MCP-1 – *Macrophage chemotactic protein-1* / Proteína quimiotática do macrófago

MFI – *Mean Fluorescence Intensity* / Intensidade de fluorescência média

MHC – *Major Histocompatibility Complex* / Complexo major de histocompatibilidade

MICA – *MHC class I polypeptide-related sequence A*

MICB – *MHC class I polypeptide-related sequence B*

MO – Medula óssea

MZ – Células B da zona marginal

NFkB – *Nuclear factor kappa B* / Fator nuclear kappa B

NGA – Mulheres não grávidas atópicas

NGS – Mulheres não grávidas saudáveis

NK – Célula Natural Killer

NKT – Célula Natural Killer T

OCS – Corticosteroide oral

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds-ratio*

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* / Padrões moleculares associados a patógenos

PB – Plasmablastos

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

pDC – Célula dendrítica plasmacitóide

PD-1 – *Programmed cell death-1*

PE – Ficoeritrina

PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila

PMA - Acetato de forbolmiristato

PRRs – *Pattern Recognition Receptors* / Recetores de reconhecimento de padrões

pTreg – Células T reguladoras periféricas ou induzidas

PU.1 – Fator de transcrição PU.1

RA – Rinite alérgica

ROC – *Receiver operating characteristic*

ROR - *Retinoic receptor related orphan receptor*

rpm – Rotações por minuto

S1P – *Sphingosine-1-phosphate* / esfingosina 1 fosfato

SABA – Agonistas beta2 de ação curta

SMAC – *Supramolecular activation complex* / Complexo de ativação supramolecular

SSC – *Side Scatter* / Dispersão Lateral

STAT – *Signal transducer and activator of transcription* / Transdutor de sinal e ativador de transcrição

T-bet – *T-box transcription factor expressed in T cells*

Tc – Células T citotóxicas

TCR – Recetor de célula T

TEM – Células T de memória efetoras terminais

Tfh – Células Th foliculares

TGF – *Transforming growth factor* / Fator de transformação de crescimento

Th – Células T *helper*/auxiliadoras

TLR – *Toll-like receptors* / Recetores tipo Toll

TNF – *Tumor necrosis factor* / Fator de necrose tumoral

TRAIL – *TNF-related apoptosis inducing ligand* / Ligando indutor de apoptose relacionado com TNF

Treg – Células T reguladoras

TSLP - *Thymic stromal lymphopoietin* / Linfopoietina do estroma tímico

tTreg – Células Treg tímicas ou naturais

uNK – Células NK uterinas

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

vs - Versus

VSR – Vírus sincicial respiratório

Zap70 – *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

Índice

Sumário	2
Abstract	5
Comunicações	8
1. Revisão da Literatura	9
1.1 O Sistema Imunitário – Perspetiva Global	9
1.2 A Resposta Imune Alérgica	27
1.3 O Paradigma Imunológico da Gravidez	35
1.4 Asma: Conceitos e Definições	46
2. Objetivos do Trabalho	55
3. Material e Métodos	56
3.1 Organização do Estudo	56
3.2 Equipamentos Laboratoriais	60
3.3 Protocolos Laboratoriais	62
3.4 Análise de Resultados	68
4. Resultados	81
4.1 Caracterização antropométrica e demográfica da população em estudo	81
4.2 O perfil imunológico da mulher não grávida com asma atópica	87
4.3 O perfil imunológico da mulher grávida do terceiro trimestre	95
4.4 O perfil imunológico da mulher grávida do terceiro trimestre com asma atópica	103
4.5 Do terceiro trimestre de gravidez ao fim do puerpério	118
4.6 Avaliação após o puerpério	134
4.7 Gravidez na mulher com asma atópica: marcadores de risco para o desenvolvimento de atopia na descendência	147
5. Discussão	165
5.1 Considerações iniciais	165
5.2 População do estudo	165
5.3 Parâmetros imunológicos – caracterização geral	167
5.4 O compartimento T	170
5.5 O compartimento B	174
5.6 As células T reguladoras	178
5.7 As células B reguladoras e o perfil citocínico regulador	181
5.8 Perfil citocínico global	184
5.9 Marcadores de risco	186
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	190
7. Referências	191

Sumário

A prevalência das doenças atópicas tem vindo a aumentar, em especial ao nível dos países ocidentalizados. Vários fatores têm sido apontados para justificar este aumento de prevalência, destacando-se o reduzido tamanho das famílias, o elevado uso de antibióticos, a melhoria das condições sanitárias, bem como a diminuição quer das infeções de helmintas, quer da contaminação orofecal.

Alguns estudos têm também avaliado a influência do ambiente pré-natal no desenvolvimento de atopia e asma. Da análise da literatura, parece inegável a importância deste período para o desenvolvimento do sistema imunitário. Neste âmbito, a transmissão de atopia à descendência em mulheres atópicas, e concretamente com asma alérgica, poderá ser moldada desde este período. A possibilidade de identificar marcadores de risco precoces para o desenvolvimento de atopia poderá ser o primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de prevenção para os indivíduos em risco.

Este trabalho pretendeu abordar o sistema imunitário materno de forma a enriquecer a sua caracterização desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério. Para além da exploração de perfis celulares e citocínicos maternos (nos quais se incluiu sobretudo a avaliação de diferentes populações de células T e B, com funções efetoras e reguladoras), foi também considerada a sua eventual relação com o desenvolvimento de atopia nas crianças.

Foram recrutadas 135 mulheres com critérios para serem incluídas num dos 4 grupos do estudo: grávidas atópicas – GA (n=24), não grávidas atópicas – NGA (n=32), grávidas saudáveis – GS (n=44) e não grávidas saudáveis – NGS (n=35). Foram caracterizadas por Citometria de Fluxo populações de leucócitos e linfócitos, com particular interesse nos perfis maturativos de linfócitos T e B, bem como nas subpopulações de células T e B reguladoras. Foi ainda efetuada uma análise funcional, para avaliar a capacidade de produção de citocinas pelos linfócitos T e B. Foram igualmente avaliadas as concentrações de citocinas séricas por ensaios imunoenzimáticos. Estes parâmetros imunológicos maternos foram acompanhados desde o terceiro trimestre de gestação, até depois do puerpério (primeiras 6 semanas após parto), e aos seis meses de idade, foi efetuada uma avaliação clínica das crianças.

As mulheres não grávidas atópicas apresentaram contagens celulares mais elevadas para a generalidade das populações leucocitárias e linfocitárias (em relação a mulheres não grávidas saudáveis). Destaca-se ainda uma maior presença de eosinófilos nas mulheres NGA ($p=0,0009$; teste de Mann-Whitney U), que tinham igualmente os seus compartimentos linfocitários T e B mais ricos em células de memória, em relação às mulheres NGS. Para os perfis de regulação, verificou-se que as células T reguladoras se encontravam percentualmente aumentadas ($p\leq 0,003$; teste de Mann-Whitney U), tal como as células T produtoras de IL10 após estimulação ($p\leq 0,03$; teste de Mann-Whitney U) em mulheres NGA. Também se observou uma maior expressão de Foxp3 ($p=0,0002$; teste de Mann-Whitney U), e ainda a diminuição dos níveis séricos de IFN- γ nas mulheres NGA ($p=0,0019$; teste de Mann-Whitney U), em relação a mulheres NGS.

De um modo geral, as alterações verificadas nos parâmetros imunológicos de mulheres grávidas atópicas no terceiro trimestre da gravidez foram semelhantes às observadas em mulheres

grávidas saudáveis. Comparadas com mulheres NGA, nas mulheres grávidas atópicas ocorreu uma alteração substancial da fórmula leucocitária, com um importante incremento de neutrófilos ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney U) e diminuição dos valores das restantes populações leucocitárias. A diminuição nas contagens de linfócitos totais estendeu-se a grande parte das subpopulações linfocitárias caracterizadas. Nos compartimentos linfocitários T e B foi possível observar uma diminuição das subpopulações de células de memória. Verificou-se igualmente na gravidez uma menor expressão de Foxp3 em mulheres GA ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney U) e ainda menos células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} circulantes ($p = 0,0012$; teste de Mann-Whitney U). Ocorreu ainda uma diminuição relativa das células T CD4 produtoras de IFN- γ em mulheres GA ($p \leq 0,024$; teste de Mann-Whitney U), e uma maior presença de células T CD8 produtoras de IL17 ($p = 0,0172$; teste de Mann-Whitney U), em relação ao observado em mulheres NGA.

Depois do puerpério, no compartimento T de mulheres do grupo GA, verificou-se um aumento das populações de células de memória. Em comparação com a gravidez, após o puerpério o compartimento B, apresentou nas mulheres GA um aumento significativo da subpopulação de células B de transição ($p < 0,0001$; teste de Wilcoxon). Verificou-se, igualmente em mulheres GA após o puerpério, uma maior expressão de Foxp3 nas células T reguladoras ($p < 0,0001$; teste de Wilcoxon) e o aumento das populações de células T circulantes produtoras de IFN- γ ($p \leq 0,0234$; teste de Wilcoxon). As modulações das populações T e B desde a gravidez até depois do puerpério ocorreram de forma semelhante nas mulheres dos grupos GA e GS. Apesar de as mulheres GA manterem um perfil imunológico próximo do das mulheres GS depois do puerpério, aconteceu também neste período um processo de reaproximação ao perfil observado nas mulheres NGA.

As mulheres GA com manifestações de risco para atopia na descendência (comparadas com mulheres GA sem manifestações de risco para atopia na descendência até aos 6 meses de vida) apresentaram uma maior proporção de células T e menor proporção de células B, percentagens mais elevadas de células T CD8 de memória efetoras, de células B de transição e de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}, e contagens mais baixas de células B de memória. Na avaliação destes parâmetros como marcadores de risco para o desenvolvimento de atopia verificou-se que o parâmetro com melhor desempenho foi a percentagem de células B de transição, com uma *Odds-Ratio* de 54,0 [IC 95%: 4,2-692,9; ($p = 0,0005$)], sensibilidade de 90,0% [IC 95%: 55,5 – 99,8] e especificidade de 85,7% [IC 95%: 57,2 – 98,2].

Este estudo foi pioneiro em Portugal, e no mundo, no que se refere ao acompanhamento do compartimento linfocitário B circulante, abordando o seu perfil de maturação, e em particular as células B com funções reguladoras, desde a gravidez até ao fim do puerpério, em mulheres atópicas e não atópicas. A este nível, encontram-se estudos na literatura a documentar a alteração do compartimento B durante a gravidez. O presente trabalho reporta agora que alterações, como a diminuição do número de células B em circulação, são impostas também na mulher atópica. Em suma, demonstrou-se a existência de um perfil imunológico característico em mulheres atópicas, que sofre alterações significativas durante a gravidez, tendendo os parâmetros imunológicos a normalizar após o puerpério.

O compartimento T, para o qual a literatura é mais rica em estudos e abordagens, demonstrou também neste trabalho oscilações características entre o período pré e pós-natal. Verificaram-se sobretudo variações nos compartimentos de células T de memória, sem grandes alterações ao nível das células Treg no que se refere à sua presença em circulação. Apenas a registar a menor expressão de Foxp3 nas células Treg durante a gestação observada em mulheres atópicas, tal como em mulheres saudáveis (como também já foi relatado em estudos anteriores). Apesar de muitos dos dados se encontrarem em concordância com a literatura, quer no que se refere às subpopulações de células de memória, quer no que se refere às células Treg, também se encontram resultados discordantes, por exemplo documentando variações numéricas nas células Treg em circulação em mulheres atópicas e mulheres atópicas grávidas. A importância de harmonizar protocolos e fenótipos, parece crucial na abordagem de estudos futuros.

Ao nível do risco para a atopia na descendência de mulheres atópicas, acrescentou-se ainda a possibilidade de definir marcadores não invasivos para a criança, em particular as células B de transição. Estas células, cuja maior presença em circulação no recém-nascido foi recentemente associada com manifestações alérgicas subsequentes, são agora apontadas já na mulher atópica, grávida do terceiro trimestre, como um elemento de risco para o desenvolvimento de atopia.

Os marcadores de risco descritos, para além de facilmente poderem vir a ser englobados no âmbito dos normais rastreios maternos durante a gravidez, apresentam ainda a vantagem da precocidade do diagnóstico, permitindo não só a possibilidade de prevenção pós-natal, mas estendendo esta possibilidade ao período gestacional.

Abstract

The prevalence of atopic diseases has been increasing, especially in Westernized countries. Several factors have been suggested to justify this increase in prevalence, as the small size of families, the high use of antibiotics, the improvement in sanitation conditions, as well as the reduction of both helminth infections, and orofecal contamination.

A few studies have addressed the influence of prenatal environment on the development of atopy and asthma. From literature, it seems undeniable the importance of the prenatal period for the development of the immune system. In this context, the transmission of atopy to the progeny in atopic women, and specifically in women with allergic asthma, can be modulated from this period on. The ability to detect early risk markers for the development of atopic diseases may be the first step in the development of prevention strategies for individuals at risk.

This study aimed to approach the maternal immune system in order to enrich its characterization from the third trimester of pregnancy until the end of the puerperium period. In addition to the evaluation of the maternal cellular profiles (in which, mostly, different populations of T and B cells with effector and regulatory functions were included) and cytokines, the relation between these profiles and the development of atopy in the progeny was also assessed.

135 women were recruited for this study, and fulfilled the inclusion criteria necessary to be included in one of the four groups preset: atopic pregnant women - GA (n = 24), atopic non-pregnant women - NGA (n = 32), healthy pregnant women - GS (n = 44) and healthy non-pregnant women - NGS (n = 35). Populations of leukocytes and lymphocytes, and particularly maturation profiles of T and B lymphocytes, as well as subpopulations of T and B cells with regulatory functions, were characterized by flow cytometry. Functional assays were also performed, to assess the ability of cytokine production by T and B lymphocytes. Serum cytokine concentrations were assessed as well by enzymatic immunoassays. These maternal immune parameters were monitored since the third trimester of pregnancy until the end of the puerperium period (first six weeks after delivery). A clinical evaluation of all the newborn children was performed at the age of six months.

Non-atopic pregnant women presented higher cell counts for most leukocyte and lymphocyte populations (compared to healthy non-pregnant women). We should also highlight the increased presence of eosinophils in NGA women ($p = 0,0009$; Mann-Whitney U test). Again compared to NGS women, NGA women showed increased memory cells within the circulating T and B lymphocyte compartments. Considering the regulatory profiles, NGA women presented higher percentages of regulatory T cells ($p \leq 0,003$; Mann-Whitney U test) and IL10 producing T cells after stimulation ($p \leq 0,03$; Mann-Whitney U), as well as increased expression of Foxp3 ($p = 0,0002$; Mann-Whitney U test), and also decreased serum levels of IFN- γ ($p = 0,0019$; test Mann-Whitney U test) compared to NGS women.

In general, the changes observed in immune parameters of atopic pregnant women in the third trimester of gestation were similar to those observed in healthy pregnant women. Comparing pregnant and non-pregnant atopic women, an important change in leukocyte subsets was observed, with a significant increase of neutrophils ($p < 0,0001$; Mann-Whitney U test) and the

consequent diminution of the remaining leukocyte populations in the GA group. The decrease in total lymphocyte counts was extended to most of the lymphocyte subsets characterized. It was possible to detect a decrease in memory cell subsets within the T and B lymphocyte compartments, also. During pregnancy, a lower expression of Foxp3 was reported in GA women ($p < 0,0001$; Mann-Whitney U test) and, besides, lesser CD24^{Hi}CD38^{Hi} B cells were present in circulation in these women, compared to NGA women ($p = 0,0012$; Mann-Whitney U test). There was still a decrease in the percentages of IFN- γ -producing CD4 T cells in GA women ($p \leq 0,024$; Mann-Whitney U test) and a greater presence of IL17-producing CD8 T cells ($p = 0,0172$; Mann-Whitney U test), compared to the levels observed in NGA women.

At the end of the puerperium, there was an increase in memory cell subpopulations within the T cell compartment of GA women. Compared with the pregnancy evaluation, after puerperium, the B cell compartment showed a significant increase in the transitional subpopulation ($p < 0,0001$; Wilcoxon test), in GA women. Moreover, after puerperium, GA women exhibited a greater expression of Foxp3 in Treg cells ($p < 0,0001$; Wilcoxon test) and there was an increase in circulating IFN- γ -producing T cells ($p \leq 0,0234$; Test Wilcoxon). The modulations of T and B cell subpopulations from pregnancy until the end of puerperium were similar in women of GA and GS groups. Although at the end of puerperium, GA women still kept an immune profile close the one observed in GS women, at this time point, there were also signs of rapprochement between the immune profiles observed in women of GA and NGA groups.

GA women with atopic manifestations in the offspring (compared to GA women without atopic manifestations in the offspring at the age of 6 months) presented higher proportions of T cells and lower proportions of B cells, higher percentages of effector memory CD8 T cells, transitional B cells and CD24^{Hi}CD38^{Hi} B cells, and, finally, lower absolute counts of memory B cells. In the evaluation of these parameters as risk markers for the development of atopy, the parameter which presented the best performance was the percentage of transitional B cells, with an Odds-ratio of 54,0 [95% CI: 4,2 to 692,9; ($p = 0,0005$)], sensitivity of 90,0% [95% CI: 55,5 to 99,8] and a specificity of 85,7% [95% CI: 57,2 to 98,2].

This study was a pioneer in Portugal, and in the world, in what concerns the monitoring of the circulating B cell compartment, addressing not only the maturation profile, but, in particular, B cells with regulatory functions, from pregnancy until after puerperium, in atopic and non-atopic women. Literature presents evidence of a typical change in circulating B cells during pregnancy. This study now reports that changes, such as the decrease in the number of circulating B cells, are also imposed by pregnancy in atopic woman. In brief, it demonstrated the existence of a characteristic immune profile in atopic women, which undergoes significant alterations during pregnancy, tending to normalize after the puerperium.

As for the T cell compartment, for which the literature is richer in studies and approaches, this study also showed characteristic fluctuations between the pre- and postnatal periods. There were variations mostly in the memory subsets within the T cell compartment, without major changes in regulatory T cells regarding their presence in circulation. Only the expression of Foxp3 in Treg cells presented lower levels during pregnancy, in both atopic and healthy women (as previously reported in other studies). Although much of the data now reported are in agreement with literature, regarding either memory cell subsets or regulatory T cells, there are also

conflicting results, for example documenting changes in the numbers of regulatory T cells circulating in atopic pregnant and atopic non-pregnant women. The importance of harmonizing protocols and phenotypes seems crucial for the establishment of future studies.

Considering the risk for atopy in the offspring of atopic women, this study added the possibility to define non-invasive markers for the child, in particular transitional B cells. These cells, whose greater presence in circulation in newborns has recently been associated with subsequent allergy development, are here identified in atopic pregnant women in the third trimester of gestation as a risk factor in the development of atopy in their progeny.

The risk factors described, besides having the capacity to easily become integrated within the normal maternal screening protocols during pregnancy, also have the advantage of an early diagnosis, allowing not only the possibility of postnatal prevention but extending this possibility to the prenatal period.

Comunicações

Comunicações Orais

1. Domingues T., Diamantino F., Lima J., Borrego L.M., **Martins C.** Perfil Imunológico de Grávidas Atópicas: marcadores de risco para a descendência. Comunicação oral. XXII Congresso Sociedade Portuguesa de Estatística – Faro, Portugal – Outubro de 2015.

Comunicações em Poster

1. **Martins C.**, Lima J., Leandro M.J., Nunes G., Favila Menezes M., da Cunha Branco J., Trindade H., Borrego L.M. Impaired Foxp3 expression in late pregnancy and at delivery. Poster. 23rd European Congress of Obstetrics and Gynaecology – Glasgow, Escócia (Reino Unido) – Maio de 2014.
2. Lima J., **Martins C.**, Borrego L.M., Leandro M.J., Nunes G., Favila Menezes M., Trindade H., da Cunha Branco J. Are Th17 cells determinant to physiological neutrophilia during Pregnancy and delivery? Poster. 23rd European Congress of Obstetrics and Gynaecology – Glasgow, Escócia (Reino Unido) – Maio de 2014.
3. **Martins C.**, Lima J., Leandro M.J., Nunes G., da Cunha Branco J., Trindade H., Borrego L.M. Peripheral blood B cells subsets in atopy. Poster. XL Annual Meeting of the Portuguese Society for Immunology – Lisboa, Portugal – Outubro de 2014.
4. **Martins C.**, Lima J., Leandro M.J., Nunes G., Cunha Branco J., Trindade H., Borrego L.M. Immune Profile in Late Pregnancy: immunological markers in atopic asthmatic women as risk factors for atopy in the progeny. Poster. Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM) – Berlim, Alemanha – Outubro de 2015.

1. Revisão da Literatura

1.1 O Sistema Imunitário – Perspetiva Global

O Sistema Imunitário diferenciou-se ao longo da evolução das espécies, assumindo como principal função a proteção do organismo contra agentes patogénicos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas. No estabelecimento desta função, foi fundamental o processo de discriminação de próprio/não-próprio, com o desenvolvimento de mecanismos de tolerância e limitação da resposta imune. Numa resposta normal, após exposição a um antígeno reconhecido como estranho, a articulação entre os mecanismos de ativação e supressão da resposta imune é sequencial e complementar, levando à homeostasia do sistema após a eliminação do agente e, na medida do possível, conduzindo à geração de memória imunológica.

A citometria de fluxo tem vindo a dar resposta às crescentes necessidades de análise celular no âmbito da Imunologia. A esta tecnologia, multiparamétrica, de elevada sensibilidade, se deve muito do conhecimento atual sobre as células do sistema imunitário e das suas relações no desenrolar da resposta imune. De crucial importância a este nível é também a utilização de anticorpos monoclonais, conjugados com compostos fluorescentes, os fluorocromos. As células podem assim ser identificadas e caracterizadas de acordo com a expressão de antígenos de superfície e outras moléculas citoplasmáticas e nucleares, especificamente reconhecidas pelo anticorpo monoclonal. Uma vez que acoplado ao anticorpo estará o fluorocromo, a respetiva emissão de fluorescência (após excitação por um laser) será posteriormente identificada pelo detetor específico no citómetro de fluxo. Regra geral, os anticorpos monoclonais seguem a nomenclatura proposta e estabelecida em *Human Leucocyte Differentiation Antigens Workshops*, assumindo a designação de *Cluster of Differentiation* (CD). Para avaliar a expressão de um antígeno numa célula, a designação mais frequente é a utilização do símbolo “+” ou “-”, a seguir ao respetivo CD, o que corresponde exatamente à presença ou ausência do antígeno na superfície, ou no interior, da célula. É também possível avaliar o nível de expressão desse antígeno, que pode ser fraco ou forte, homogénea ou heterogénea. Neste trabalho, a expressão positiva de um antígeno será assinalada com “+”, a ausência de expressão com “-”, a expressão forte com “Hi” e a expressão fraca com “Dim”.

Aprofundando a análise dos mecanismos envolvidos na resposta imune percebemos, academicamente, que esta resposta se pode dividir em dois grandes braços: os mecanismos de resposta inatos e os mecanismos de resposta adaptativos.

1.1.1 A Resposta Imune Inata

Encontramos na resposta inata distintas barreiras fisiológicas (físicas, químicas e mesmo microbiológicas), diferentes populações celulares (maioritariamente neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos, células dendríticas - DCs, e células *Natural Killer* – NK) e outros mediadores imunes, como as proteínas de fase aguda ou os fatores do sistema do complemento.

No sangue periférico, neutrófilos, eosinófilos e basófilos representam a população de leucócitos granulares, os granulócitos. Partilhando progenitores comuns ao longo da diferenciação hematopoiética, estas células constituem-se depois como populações distintas na linhagem mieloide, cuja maturação é promovida por interleucina (IL)3 e fator de estimulação de colónias

granulocítico-macrofágicas (GM-CSF) (1). Assumindo protagonismo a partir da infância, o neutrófilo é a célula mais abundante em circulação (dentro dos leucócitos). Assume funções na resposta inata, sobretudo nos processos fagocíticos, onde colabora também com a secreção dos mediadores transportados nos seus grânulos (mieloperoxidase, lisozima, defensinas, elastase, entre outros). Sensível a processos quimiotáticos, como os decorrentes do processo inflamatório, o neutrófilo possui capacidade migratória, sendo a principal população a ser recrutada para o local da agressão, onde efetua um ciclo de fagocitose e segrega mediadores pró-inflamatórios, como a IL6 (2, 3). Os eosinófilos são células menos representadas dentro dos leucócitos circulantes. Os seus grânulos, ricos em mediadores tóxicos, como a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP) ou a Proteína Básica Major (MBP), conferem-lhes capacidades citotóxicas importantes, em particular, na resposta a infeções antiparasitárias, sobretudo a helmintas. Estão também implicados nas respostas alérgicas, podendo identificar-se a sua presença também ao nível das mucosas (gastrointestinal, respiratória e genito-urinária) (1). Os basófilos constituem uma população residual em circulação (com valores normais inferiores a 1%, em relação ao total de leucócitos). A sua presença na pele, vias respiratórias e intestino, permite a sua contribuição em respostas alérgicas e antiparasitárias, podendo inclusive recrutar eosinófilos. Com grânulos ricos em histamina e heparina, e com capacidade de produção de prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, o basófilo promove processos inflamatórios, mas funções limitadoras da inflamação também lhe podem ser atribuídas pela produção de anfiregulina (4). O mastócito, com um período de vida mais longo que o basófilo, matura ao nível dos tecidos, sofrendo modulação da sua diferenciação de acordo com o local onde esta ocorre. Tem mediadores semelhantes ao basófilo, acrescentando-se em especial a triptase. É relevante a sua ligação à resposta alérgica e aos processos inflamatórios (5-7). Grande parte das ações de eosinófilos, basófilos e mastócitos são mediadas pelo reconhecimento da Imunoglobulina (Ig) E pelos seus recetores.

Ainda no âmbito da resposta inata temos as ações citotóxicas das células NK perante células infetadas por vírus ou bactérias intracelulares, e células tumorais. Utilizam para isso mediadores como perforina e granzima, curiosamente presentes também nas células citotóxicas da resposta adaptativa. Tradicionalmente definidas como linfócitos $CD16^+CD56^+CD3^-$, encontramos neste compartimento duas subpopulações: $CD56^{Dim}CD16^+$ NK (células granulares, primordialmente citotóxicas), e $CD56^{Hi}CD16^{Dim}$ (células com uma maior capacidade de produção de citocinas, e efeito citotóxico limitados, com menos grânulos) (8).

Com forte capacidade fagocítica e posterior capacidade de apresentar antígenos a células da resposta adaptativa, encontramos as células do sistema de fagócitos mononucleares. Em circulação estão sobretudo os monócitos, células capazes de atravessar os endotélios, mesmo em repouso, relocando-se para os tecidos onde vão sofrer programas de diferenciação variados. Os monócitos podem de facto originar macrófagos tecidulares, mas estes têm também capacidade de autorrenovação. O macrófago possui capacidade de apresentação de antígenos no contexto das suas moléculas de MHC (Complexo major de histocompatibilidade) de classe I mas também de classe II (9).

Talvez mais controversa que a origem do macrófago é a relação desta população com as DCs. As DCs têm uma morfologia estrelada e uma grande capacidade de apresentação de antígenos, com particular importância na ativação das células T naïve (10). As DCs são uma população pouco representada na circulação periférica (aproximadamente 1% das células mononucleares

do sangue), mas encontram-se também nos órgãos linfoides secundários, e sobretudo nos tecidos, onde são sentinelas do sistema imunitário (11). Definem-se normalmente como células apresentadoras de antígeno. De um modo geral as DCs convencionais ou mieloides (cDCs) apresentam no estadio imaturo forte capacidade de captação de antígenos, que são internalizados por fagocitose, pinocitose ou endocitose. A partir da captação do antígeno começam alterações profundas na DC, que inicia a sua maturação em simultâneo com o processo de migração da DC para os órgãos linfoides secundários.

Para além das cDCs, foram também identificadas DCs plasmacitóides (pDCs) que representam uma população distinta, cuja função está relacionada com o reconhecimento de vírus e ácidos nucleicos estranhos, com a subsequente rápida secreção de interferões do tipo I, α/β , com forte atividade antiviral (12).

As funções da resposta inata são mediadas sobretudo pelo reconhecimento de padrões moleculares, em particular associados a agentes patogénicos (*Pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) e/ou a processos de lesão dos tecidos (*Danger-associated molecular patterns* – DAMPs) (13). Intimamente ligados ao reconhecimento de PAMPs (moléculas exógenas, partilhadas por vários microrganismos, como o lipopolissacárido da parede das bactérias Gram negativas, ou a flagelina, das bactérias flageladas), e de DAMPs [moléculas de deteção de perigo do tipo endógeno, como as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs)], estão os recetores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs). Estes existem na superfície de vários tipos de células imunes, sendo os recetores tipo *Toll* (*Toll-like receptors* - TLR) o exemplo mais paradigmático. Em 1980, os recetores *Toll* foram identificados em *Drosophila melanogaster*, a mosca da fruta. A proximidade destes recetores aos posteriormente encontrados em leucócitos, no humano, levou à sua designação como *Toll-like* (13). A esta forma de reconhecimento não opsónica, a resposta inata acrescenta ainda a capacidade de reconhecer os agentes patogénicos desde que ligados a outros mediadores intrínsecos, tais como as opsoninas.

Desde que uma célula fagocítica, predominantemente macrófagos e neutrófilos, reconheça um agente patogénico, dá-se início à resposta, através dos mecanismos fagocíticos, que promovem não só a destruição do agente patogénico, mas também, de forma muito particular, a segregação de mediadores cruciais para a continuidade do processo inflamatório.

1.1.2 A Resposta Imune Adaptativa

De forma elegante, as DCs assumem um papel de ponte entre a resposta inata e a resposta adaptativa. Partilhando com macrófagos e neutrófilos um potencial fagocítico importante, a que se acrescentam outros processos de captação de antígeno como a macropinocitose, a DC inicia um processo de maturação após a captação de antígenos, iniciando aqui também uma viagem até aos órgãos linfoides secundários. Na zona paracortical dos órgãos linfoides secundários vai então dar-se o encontro das DCs com as células T naïve, tendo estas últimas ultrapassado o apertado crivo de seleção de repertório imposto pelo estroma tímico. Atraídos pela rede de quimiocinas secretadas pelas DCs, as células T naïve vão agora ser ativadas num processo altamente controlado e conhecido como *priming* das células T naïve. Assim, a apresentação antígenica, levada a cabo pela DC madura que exhibe os seus antígenos processados no contexto das moléculas de MHC, que no humano assumem o nome de antígenos leucocitários humanos

(HLA), é o elemento chave para o começo da resposta adaptativa. De uma intrincada rede de sinais ao nível da sinapse imunológica resulta a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T, específicos para o antígeno que está a ser apresentado. Na resposta adaptativa encontramos então elementos diferenciados, os linfócitos, que transportam recetores especializados envolvidos no reconhecimento específico dos antígenos, característico deste tipo de resposta imune.

A resposta adaptativa tem características distintas da resposta inata, como a elevada especificidade dos recetores, e a capacidade de geração de respostas de memória. Pode dividir-se em resposta humoral, quando levada a cabo por imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B, e celular, quando na sua génese encontramos células T efectoras, diferenciadas após a ativação das células T naïve. As células T efectoras podem ser auxiliaadoras, designadas por células Th (*helper*), ou citotóxicas, denominadas células Tc. A cooperação entre os diferentes elementos da resposta adaptativa é fundamental para o seu sucesso, uma vez que estes se apresentam como processos complementares. Aliás, esta complementaridade estende-se à colaboração da resposta inata e da resposta adaptativa. Nas fases iniciais da ação contra os agressores, por exemplo, são os mecanismos inatos que suportam a resposta, enquanto se desenvolvem, nos órgãos linfoides secundários, os mecanismos mais especializados da resposta adaptativa.

1.1.3 A Ativação do Linfócito T

O desenrolar da resposta adaptativa inicia-se com o processo de ativação T, mediado pela apresentação de antígenos. A este nível, as DCs destacam-se de outras células apresentadoras de antígeno (CAP), nomeadamente macrófagos e linfócitos B, sendo ímpares no *priming* das células T naïve.

Inicialmente, é a interação do TCR (recetor de célula T) das células T CD4 com as moléculas de MHC de classe II (que apresentam o seu antígeno específico), que condiciona a ativação do linfócito pela DC. Mas, o sucesso desta interação resulta de uma ligação estável mantida por várias moléculas sinalizadoras, sob pena de o linfócito T entrar num estado irreversível de anergia (o que acontece caso não receba os sinais da ligação TCR/MHC-péptido acompanhados por uma devida co-estimulação). No centro da sinapse imunológica encontra-se o SMAC (*supramolecular activation complex*) (14), onde se acumulam exatamente as zonas de ligação TCR/MHC-péptido (no caso da célula T CD4, estabilizadas também pela ancoragem do co-recetor CD4 ao domínio $\beta 2$ da cadeia β da molécula de MHC de classe II, e no caso da célula T CD8⁺, pela ancoragem do co-recetor CD8 ao domínio $\alpha 3$ da cadeia α da molécula de MHC de classe I). Para o SMAC são ainda recrutados os recetores CD28 do linfócito T, elementos major da co-estimulação, que estabelecem aí ligação com os seus ligandos, as moléculas do complexo B7 (B7.1, também conhecido como CD80, e B7.2, também conhecido como CD86) da célula apresentadora (15). A reforçar a estabilidade da ligação célula T-CAP acontecem interações entre moléculas de adesão e os seus ligandos, com integrinas como o LFA-1 (*Leucocyte Function-associated Antigen-1*) ou o LFA-2 (CD2). Estas ligações transitórias de baixa afinidade, vão sustentar a proximidade entre as células, de forma a garantir que a ligação TCR/MHC-péptido dure o tempo necessário para uma ativação adequada do linfócito T (16), ao mesmo tempo promovendo a capacidade apresentadora da DC e a própria afinidade das ligações. Assim, a sinapse imunológica madura é uma região altamente estruturada, onde coexistem três domínios

concêntricos bem definidos, os SMAC central, periférico e distal, que concorrem para uma efetiva ativação da célula T (14).

Se a interação entre recetores co-estimuladores da célula T e os seus ligandos nas células apresentadoras de antigénio constituem o segundo sinal necessário à ativação que leva a célula T a proliferar, entrando num processo de diferenciação, quando a ligação às moléculas do complexo B7 é feita via CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), são enviados sinais inibitórios para o linfócito T (17, 18). Em suma, este recetor, que compete com o CD28 pelos respetivos ligandos, possuindo mesmo maior afinidade para a ligação a CD80/CD86, surge nas células T ativadas como mecanismo de regulação da ativação (19).

Quando a célula T naïve é competentemente ativada, inicia um processo de sinalização, onde se destacam cinases como a Zap70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) e a Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*). A subsequente ativação de fatores de transcrição, com a produção de citocinas solúveis pelo linfócito T, de forma autócrina, vão condicionar a sua proliferação e sobrevivência. A IL2 é o exemplo mais paradigmático deste mecanismo. Não só a transcrição do gene que a codifica surge promovida no decorrer da ativação do linfócito T naïve, como também a transcrição do gene da cadeia α do seu recetor (IL2R α - CD25) surge nas células T ativadas. O aumento de expressão do ligando do CD40 na célula T CD4 ativada vai permitir a sua ligação ao CD40 na DC, garantindo, segundo alguns autores, o seu licenciamento (DC *licensing*) (20). Assim, cooperando numa rede de feedback positiva, que dá continuidade aos fenómenos de apresentação e co-estimulação, a DC está também envolvida na produção de citocinas, que garantem, por sua vez, a proliferação e subsequente diferenciação dos linfócitos T em células efetoras e células de memória (20). Após a eliminação do agente agressor, a recuperação do estado de homeostasia linfocitária acontece com a eliminação das células efetoras. Sobrevive um pequeno número de células de memória, igualmente específicas para antigénios do agressor, que vão garantir uma proteção duradoura em caso de novo contacto (21).

1.1.4 A Diferenciação do Linfócito T CD4

O perfil de diferenciação das células T CD4 é um ponto crucial para a modulação das respostas imunes, com efeitos quer na resposta adaptativa, quer na resposta inata. Destaca-se a diversidade de opções, com os perfis clássicos de células Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg), aos quais têm vindo a acrescentar-se novas subpopulações, como é o caso das células Th foliculares (Tfh). Os avanços nas tecnologias de identificação e caracterização celular desta área das biociências, como é o caso da Citometria de Fluxo, têm contribuído fortemente para este acréscimo nos últimos anos. Assim, a célula T CD4 ativada vai poder diferenciar-se em distintos tipos de célula efetora Th, podendo assumir uma grande variedade de funções. A polarização das respostas vai ser desencadeada pela força da sinalização (22) e pela amplificação de fatores de transcrição mediada por ação de citocinas (23).

Inicialmente descritas como interleucinas, por mediar a comunicação entre várias populações de leucócitos, as citocinas viram crescer a sua família de sinalizadores (24). Estas proteínas glicosiladas de baixo peso molecular, maioritariamente secretadas por células do sistema imunitário, mas não só, colaboram na regulação da generalidade dos mecanismos imunológicos, estendendo a sua atuação aos sistemas hematopoiético, endócrino, e

neuroológico, entre outros. A plasticidade de efeitos que asseguram implica que estes potentes mediadores solúveis sejam altamente regulados. Encontram-se evidências, concretamente, da fragilidade dos seus ácidos ribonucleicos mensageiros (mARN) nos processos de transcrição e tradução, potenciando o controlo das ações das citocinas pela sua limitação temporal. (25). O pleiotropismo, i.e. a capacidade de gerar diferentes efeitos biológicos em diferentes células alvo, e também a redundância, ou o facto de diferentes citocinas poderem gerar o mesmo efeito, tornam complexa a interpretação das suas ações, que de forma autócrina, endócrina ou parácrina, são mediadas pelos diferentes recetores de citocinas expressos nas células. Contudo, é toda a interação com o meio circundante (tecidos, células e substâncias ativas, como outras citocinas e hormonas) que define o papel e o efeito biológico de uma citocina numa situação particular.

O *milieu* citocínico gerado no decorrer das fases iniciais da resposta imune vai ser preponderante para o destino da célula Th (26-30). As citocinas presentes, secretadas por células apresentadoras de antígeno, pelas próprias células T ou por células circundantes, vão muitas vezes ser redundantes para a via que promovem, sendo efetivamente produzidas pelas próprias células cuja diferenciação induziram. A interação de citocinas com os seus recetores específicos vai dar origem à ativação de fatores de transcrição latentes, no caso da diferenciação Th, associando-se a cada subpopulação celular a ativação de um fator de transcrição regulador e de uma proteína STAT (*signal transducer and activator of transcription*) característicos. Assim, para as células Th1, estes fatores são *T-box transcription factor expressed in T cells* (T-bet) e STAT4; para as células Th2, *GATA-binding protein 3* (GATA-3) e STAT6; para as células Th17, *retinoid orphan receptor γ t* (ROR γ t) e STAT3; para as células Treg, *Forkhead box protein 3* (Foxp3) e STAT5; e para as células Tfh, *B-cell lymphoma 6* (Bcl-6) e STAT3 (31). Grande parte das células efectoras diferenciadas vai emigrar para o exterior dos órgãos linfoides secundários, permanecendo aqui sobretudo as células Tfh.

Na origem da diferenciação Th1 está a produção de Interferão (IFN)- γ e IL12 por macrófagos, DCs e células NK presentes no processo inflamatório. Estas citocinas, e sobretudo a IL12, o mais potente indutor da diferenciação Th1, conduzem à ativação dos fatores de transcrição acima descritos para esta via, que por sua vez vão levar à produção sobretudo de IFN- γ , mas também IL2 e linfotóxina α (32). Desta forma, as células Th1, produtoras de IFN- γ , vão assumir funções na resposta imune contra agentes patogénicos intracelulares, atuando como potentes promotores da atividade citotóxica das células Tc e também da atividade microbicida dos macrófagos. A produção de IFN- γ promove a sua própria via de diferenciação, inibindo em simultâneo a diferenciação e a produção de citocinas do perfil Th2 (33).

Por seu lado, a IL4 assume um papel crucial para o desenvolvimento de células Th2 (34), produtoras de IL4, IL5 e IL13. É sobretudo na resposta contra agentes extracelulares, e particularmente helmintas, que se promove a diferenciação Th2. Após estimulação, as populações de mastócitos, basófilos e eosinófilos parecem ser grandes fontes de IL4 (35). No decorrer das respostas Th2, contudo, as próprias células Th2 contribuem para a sua diferenciação pela produção desta citocina. De forma semelhante ao que acontece com o IFN- γ face às respostas Th1 e Th2, também a IL4 promove a sua própria via de diferenciação (Th2), inibindo a resposta Th1. Aliás, este efeito de feedback positivo para a própria via, e de feedback negativo para a via de diferenciação oposta (neste caso Th1 versus Th2), estende-se aos

respetivos fatores de transcrição (36-38). Através da mediação das citocinas IL4 e IL13, as células Th2 promovem a produção de IgG₁ e IgE pelas células B (39). Quanto à IL5, as suas funções vão direcionar-se para as populações de eosinófilos, basófilos e mastócitos. Para os eosinófilos, a IL5 promove a sua diferenciação a partir dos precursores hematopoiéticos na medula óssea, mas também a sua migração, ativação, e sobrevivência (40, 41). Juntamente com a IL13, a IL5 promove também a ativação de mastócitos, e é ainda fator importante na diferenciação de basófilos (41, 42).

Um *pool* variado de citocinas contribui para o desenvolvimento da população de células Th17, através da ativação dos fatores RORC (ROR γ t em ratinho) e STAT3 (43, 44). Concretamente, as citocinas Fator de Transformação do Crescimento (TGF)- β , IL1 β , IL6, IL21 e IL23 organizam-se num processo trifásico de diferenciação, amplificação e estabilização desta via (45, 46), que culmina com uma população produtora de IL17A e IL17F, mas também de IL21, IL22, GM-CSF, e da quimiocina CCL20. Esta população, que se associa aos processos imunes das mucosas, é de primordial importância na resposta para patógenos extracelulares, onde se encontram bactérias, parasitas, fungos e leveduras (47, 48). A população Th17, cujas citocinas chave são a IL17 e a IL22, está também envolvida na manutenção dos processos inflamatórios, bem como na ativação e recrutamento de neutrófilos (49, 50). Estão também descritas as suas ligações à patogénese de várias doenças autoimunes e inflamatórias (47).

As subpopulações seguintes de alguma forma escapam ao chavão de célula Th implicada na resposta direta à agressão. Reconhecidas pelas suas funções diferenciais em relação aos restantes perfis de células Th efetoras, as células Treg são especializadas na supressão das respostas imunológicas. A sua existência é crucial para a limitação da lesão tecidual após se ultrapassar o evento agressor. As células Treg são, contudo, uma população heterogénea quanto à sua origem, atividade funcional e estadió de ativação.

Em 1995, pela primeira vez, dentro das células T CD4⁺CD25⁺, foi identificada uma subpopulação com funções reguladoras (51). Inicialmente foi com ceticismo que se admitiu uma população T com estas capacidades e com expressão de CD25, um marcador caracteristicamente presente em células ativadas. No entanto, estas questões de alguma forma foram sendo ultrapassadas com a discriminação de células T CD25⁺, células efetoras, e de células T com expressão de níveis mais elevados de CD25 (CD25^{Hi} ou CD25⁺⁺), as células Treg (52). Em 2003, a identificação do fator de transcrição Foxp3 foi fundamental para a análise e caracterização das células Treg, uma vez que este fator parece ser necessário para o seu desenvolvimento e para a execução das suas funções (53, 54). Recentemente foi proposta a utilização de CD127, o recetor da IL7, para a identificação das células Treg. Em humanos, a identificação das células T CD4⁺CD25^{Hi}CD127^{-/Dim} tem vindo a ser utilizada como forma de caracterização das células Treg, uma vez que a expressão de CD127 se correlaciona inversamente com os níveis de expressão de Foxp3 (55, 56).

Na realidade, as células Treg podem desenvolver-se precocemente como uma linhagem independente no processo de maturação T no timo, as células Treg naturais ou tímicas (tTreg), constituindo uma população de células T CD4⁺CD25^{Hi}Foxp3⁺. Na periferia, com a ativação de células T CD4 num ambiente citocínico polarizado pelo TGF- β , pode promover-se também a diferenciação de células Treg periféricas ou induzidas (pTreg) a partir da população de células T CD4⁺CD25⁻ (57, 58). A população de células pTreg, que se diferenciam à periferia, encontra-se

atualmente bastante compartimentalizada em diferentes subtipos, de acordo quer com o seu perfil de expressão imunofenotípico, quer com as suas capacidades funcionais, por exemplo, ao nível da secreção de citocinas como a IL10 ou o TGF- β (59, 60). Resumem-se brevemente na tabela 1 algumas das populações Treg reconhecidas. Nos mecanismos de ação das células Treg encontramos assim a secreção de citocinas, como TGF- β e IL10, com forte potencial imunossupressor. No entanto, para além da produção de citocinas, as células Treg podem agir diretamente sobre outras células T efetoras por mecanismos citotóxicos, onde voltamos a encontrar mediadores como as perforinas e granzimas, mas também outras vias indutoras de morte celular, como a via TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)/DR5 (*death receptor 5*) (61-63). Apesar de alguma controvérsia neste ponto, outro dos mecanismos de ação das células Treg prende-se com a disrupção metabólica da célula alvo efetora (64). Assim, a alta afinidade das células Treg para a IL2, mediada pela expressão do seu recetor de alta afinidade, promove o consumo da citocina, privando outros linfócitos deste importante fator de sobrevivência. Ainda através de contacto célula a célula se estabelece a função reguladora, nomeadamente através de recetores como o CTLA-4 ou o *lymphocyte-activation gene 3* (Lag3) (65, 66), possivelmente envolvidos também em processos de supressão do vizinho (*bystander suppression*) (67). Através destas ligações, as células Treg podem igualmente modelar as DCs a que se liguem, suprimindo a ativação de outros linfócitos T que a ela estejam ligados, mesmo com especificidade antigénica distinta (68). Para além da sua função na homeostasia da resposta imune, as células Treg são também de elevada importância como complemento dos processos de tolerância central. Na periferia podem mediar a supressão e eliminação de potenciais células auto-reativas que possam ter escapado à triagem tímica, e mesmo, colaborar nos mecanismos de tolerância contra antigénios alimentares, microrganismos comensais, ou outros antigénios ambientais.

As células Tfh, com importante função de regulação no desenvolvimento das células B nos centros germinativos, foram recentemente descritas enquanto população distinta através do reconhecimento da sua expressão de CXCR5 (69, 70). A sua localização primordial nas zonas de interação B-T e nas regiões interfoliculares permite assim que as células Tfh interajam com as células B por contacto direto, mas também, através da produção de citocinas (71). Desta interação vai estar dependente a própria formação dos centros germinativos (CGs), e a subsequente ativação e diferenciação dos linfócitos B. Estima-se assim a importância das células Tfh na produção de anticorpos da resposta humoral, estando intimamente ligada à maturação da afinidade destes recetores, e mais ainda à troca do isótipo, processos fundamentais dos CGs. A ativação dos fatores Bcl6 e STAT3 é crucial para o desenvolvimento das células Tfh, supostamente com a presença coadjuvante de IL6 e IL21 no modelo animal. Apesar de a própria IL21 poder induzir expressão de IL21 nas células T CD4 humanas, a ação da IL12 é substancialmente maior no humano (72, 73). Apesar disso, a IL21 é uma das citocinas-chave do perfil Tfh, mesmo não sendo exclusiva a sua produção por estas células. Uma vez mais se encontra nos perfis de diferenciação T um efeito positivo de uma citocina em relação à sua própria produção, já que a IL21 é indutora da diferenciação Tfh, e é depois produzida por estas células (74, 75). Curiosamente, a citocina IL4, com forte ligação ao perfil Th2, é produzida pelas células Tfh de forma independente (das células Th2). De facto, têm surgido evidências de que as células Tfh são a principal fonte de IL4 nos nódulos linfáticos reativos em infeções parasitárias, não parecendo contudo produzir IL13 (76, 77).

Tabela 1 - Subpopulações de células T reguladoras: características e funções. Adaptado de Zhang e colaboradores (59).

Subpopulação	Marcadores específicos	Produtos da secreção	Ações	Origem da Diferenciação
Células T reguladoras naturais (nTreg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	IL10, TGF-β	Bloqueio da proliferação de células T; Supressão de DCs; Inibição das células efectoras Th1, Th2, Th17; Supressão de produção de IgE específicas de alérgenos; Indução da secreção de IgG4; Supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos; Interação com células residentes dos tecidos; Participação na remodelação dos tecidos.	Timo
Células T reguladoras ICOS⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ICOS ⁺	IL10, IL17, IFN-γ	Supressão de células T CD8 ⁺ específicas para haptenos.	nTreg
Células T reguladoras indutíveis (iTreg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	IL10, TGF-β	Semelhantes a nTreg.	Periferia
Células T reguladoras do tipo 1 (Tr1)	CD4 ⁺ CD25 ⁺	IL10	Supressão da migração e função de células Th efectoras; Supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos.	Precursos não Treg, seguindo para o pulmão e nódulos linfáticos.
Células T reguladoras IL17⁺ Foxp3⁺	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ RORGTf	IL17	Inibição da proliferação de células T CD4 ⁺ efectoras.	Células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ do sangue e tecido linfóide.

DCs – Células dendríticas, ICOS - *Inducible co-stimulator* / Co-estimulador indutível, TGF-β - *Transforming growth factor* / Fator de transformação de crescimento, Treg – Células T reguladoras.

Apesar de as células T_{fh} apresentarem características distintivas, que permitem a sua caracterização como uma linhagem independente, como defendem aliás vários autores (69-71), não é consensual esta afirmação. As evidências da plasticidade na produção de citocinas (incluindo IL21, IL4 ou IFN-γ) por parte das células T_{fh} podem significar, em alternativa, que estas células correspondam a um estadio fenotípico comum às linhagens Th1, Th2 e Th17 (32). Para acrescentar ainda mais controvérsia a este tema, foram descritas recentemente células T foliculares reguladoras (T_{fr}). As células T_{fr}, com características fenotípicas semelhantes às T_{fh} (expressão de CXCR5, PD-1, ICOS, e Bcl6), mas com efeitos opostos ao nível da regulação da resposta B, já que, como o próprio nome indica, partilham características com as células Treg (nomeadamente expressão de Foxp3, CTLA-4, CD25, e GITR) (78), não parecem contudo diferenciar-se em T_{fh} ou ter origem nesta população celular (79).

Outros perfis de células Th têm vindo à ribalta nos últimos anos. O estabelecimento destas subpopulações de células Th tem sido dificultado pela rede complexa de mecanismos de sinalização envolvidos no seu desenvolvimento. Em concreto, reconhecemos as células Th9 pela produção de IL9 (80, 81). Recentemente foi descrito o desenvolvimento desta linhagem a partir da sinalização via IL2, em conjugação com TGF-β e IL4. Estes sinais vão depois mediar a ativação de fatores de transcrição como IRF4 (*IFN regulatory factor 4*), PU.1, e STAT-6 (82, 83). Apesar da sua capacidade de produção de outras citocinas, é sobretudo a IL9 que condiciona a ação das células Th9, às quais se atribui um papel protetor na resposta contra parasitas, mas também na imunidade anti-tumoral. Pelo contrário, efeitos patológicos têm sido apontados a esta população, nomeadamente conducentes à promoção de doenças alérgicas e autoimunes (84).

A identificação de uma população de células Th produtoras de IL22 (85, 86) levou à sua identificação como células Th22 (87), que também produzem Fator de necrose tumoral (TNF)- α , mas não IFN- γ , IL4 ou IL17. Como indutoras desta via de diferenciação, foram assinaladas as citocinas IL6 e TNF- α , em colaboração com pDCs, uma linhagem distinta das DCs convencionais (86). O fator de transcrição Ahr (*aryl hydrocarbon receptor*) tem sido mencionado como elemento necessário para a diferenciação Th22 (88). Com uma localização preferencial ao nível dos epitélios, onde ativam a resposta imune dos queratinócitos, as células Th22 parecem ter nestes locais mecanismos pró-inflamatórios distintos dos descritos para as células Th17, apesar de partilharem a produção de IL22. Designadamente, a capacidade pró-inflamatória das células Th17 é continuada, mas é ocasional nas células Th22 (89). De facto, a própria IL22 é ambígua no que se refere às suas capacidades inflamatórias, podendo atuar de forma protetora ou prejudicial na resposta imune dos epitélios (87). Por sua vez, as células Th22 promovem proliferação e migração de queratinócitos, garantindo a integridade da pele, mas podem, em contraposição, amplificar as respostas imunes nos processos inflamatórios dos epitélios (89).

A acrescentar às caraterísticas supra indicadas, têm vindo a associar-se diferentes perfis de expressão de recetores de quimiocinas aos diferentes perfis de células Th. Esta expressão diferencial parece suportar diferentes processos de recrutamento e tropismo para cada população, dado o potencial das quimiocinas, um tipo particular de citocinas. Atualmente, estão descritas 4 grandes famílias de quimiocinas, cuja separação se baseia no arranjo de resíduos N-terminais de cisteína (C) na estrutura proteica destes ligandos (CCL – com dois resíduos C adjacentes; CXCL – com qualquer outro aminoácido, X, a separar dois resíduos C; CX3CL – com três outros aminoácidos a separar os resíduos C, e (X)CL – com apenas um resíduo C). Os respetivos recetores das quimiocinas de cada família serão chamados de CCR, CXCR, CX3CR e (X)CR (90, 91).

A Figura 1 sumariza as caraterísticas dos perfis Th assinalando igualmente citocinas e recetores de quimiocinas associados a cada população celular.

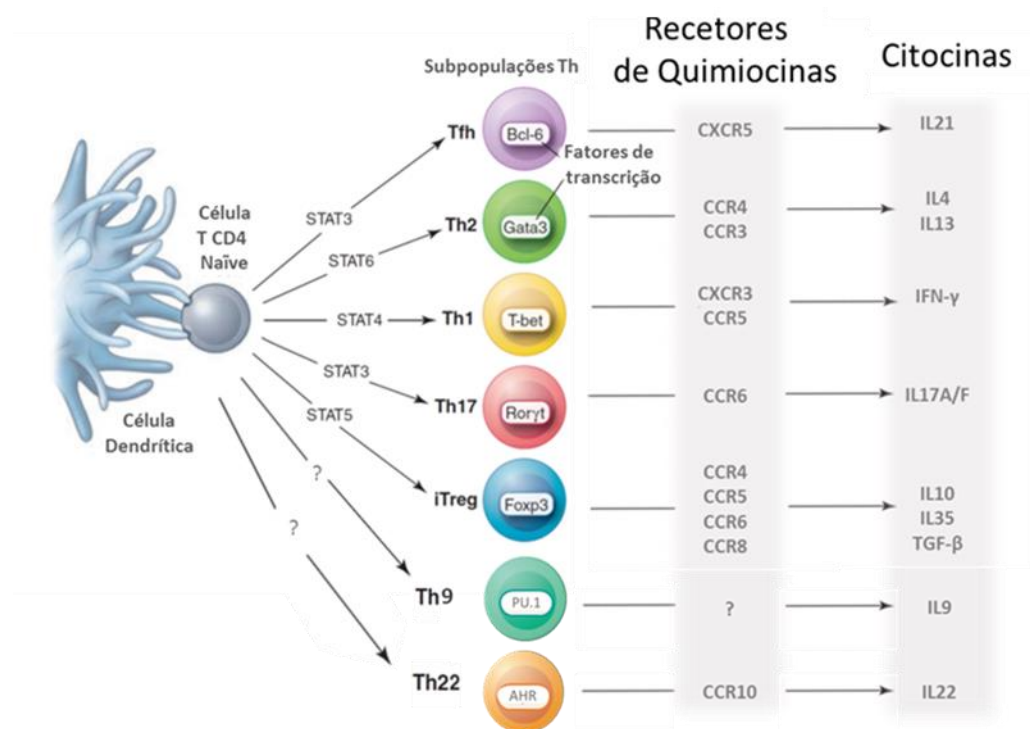


Figura 1 – Perfis de diferenciação das células T CD4, com os principais fatores de transcrição, receptores de quimiocinas, e citocinas secretadas por cada subpopulação efetora Th. Adaptado de O’Shea e colaboradores e de Jutel e colaboradores (31, 92).

TGF-β - *Transforming growth factor* / Fator de transformação de crescimento, Treg – Células T reguladoras.

De forma peculiar, como aliás já se reportou anteriormente para os perfis Th1 e Th2, há intrincadas vias de ativação e inibição que se estabelecem entre as várias subpopulações celulares e as respetivas vias de diferenciação, como segue exemplificado na Figura 2. Se por um lado estas relações reforçam a ideia de cooperação e controlo recíproco que acontecerá entre as diferentes respostas Th, também parecem recordar-nos que cada uma destas divisões é um modelo simplificado que facilita a compreensão dos principais mecanismos da resposta, que afinal estão truncados numa rede muito mais complexa. A mostrar isso mesmo, sobretudo no contexto de respostas imunes contra importantes agentes infecciosos, como o vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou o *Mycobacterium tuberculosis*, os avanços nas metodologias de análise celular têm permitido identificar células com capacidade de secreção de várias citocinas (93), chamadas de células polifuncionais (94, 95). Estudos no âmbito da Microbiologia e da Vacinação têm reportado células T polifuncionais com vantagens funcionais perante as suas congêneres monofuncionais (que só secretam um tipo de citocina) (96), como acontece com as células T polifuncionais produtoras de IFN-γ, IL-2, e TNF-α. Concretamente esta subpopulação encontra-se associada ao controlo da resposta imune em infeções virais crónicas, enquanto as células T monofuncionais IFN-γ⁺ são mais destacadas em condições agudas ou quando falham os mecanismos de controlo da infeção crónica (94). Este conceito de plasticidade associa-se também às células Th2, que podem ser induzidas a expressar IFN-γ, ou às células Th17, onde tem sido possível, de igual modo, a caracterização de subpopulações celulares com co-expressão de IL17 e de citocinas dos perfis Th1 e Th2, possivelmente envolvidas em processos de

diferenciação continuados nestas populações (97). Recentemente, foi descrita uma população de células T polifuncionais IL17⁺IFN- γ ⁺, com aparente localização preferencial ao nível do pulmão (98).

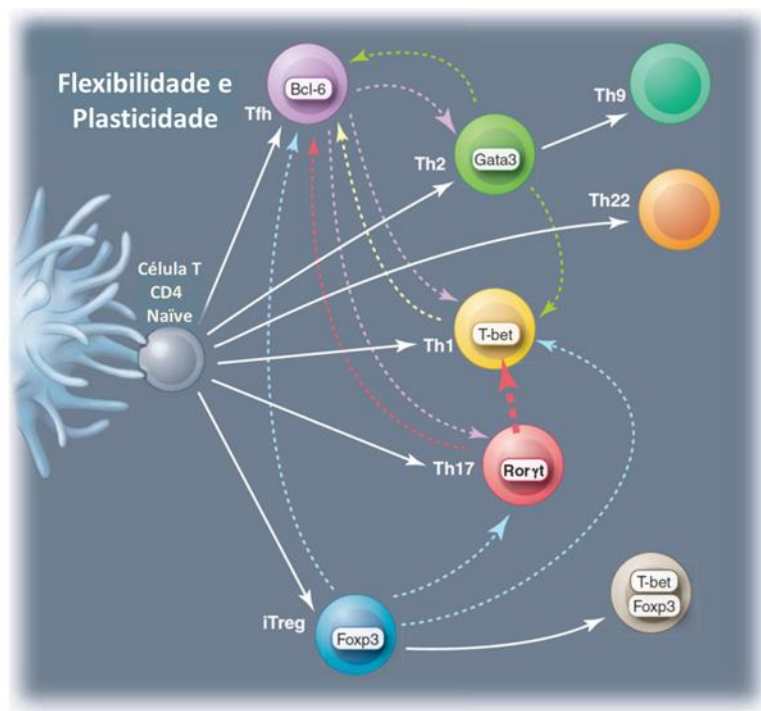


Figura 2 – Flexibilidade e plasticidade da diferenciação das células T CD4, com algumas das relações estabelecidas entre populações celulares. Setas contínuas: regulação positiva; setas a tracejado: regulação negativa. Adaptado de O’Shea e colaboradores (31).
Treg – Células T reguladoras.

1.1.5 A Diferenciação do Linfócito T CD8

Geralmente dependente da ativação inicial do linfócito T CD4, que como vimos exerce um efeito benéfico nas capacidades de apresentação das DCs, vai acontecer também a ativação das células T CD8 naïve. Os mecanismos de apresentação de antígeno são idênticos, agora via moléculas de MHC de classe I e moléculas de co-estimulação. A subsequente diferenciação como célula efetora vai permitir que a célula Tc, prescindindo da co-estimulação, reconheça à periferia sobretudo células infetadas por vírus e células tumorais. Considerando a expressão das moléculas de MHC de classe I em todas as células nucleadas, qualquer célula do organismo poderá assim processar péptidos virais ou tumorais, apresentando-os a células Tc específicas para esses mesmos antígenos. Quando uma célula Tc efetora reconhece estes antígenos, a reorganização do seu citosqueleto vai orientar os mediadores citotóxicos, i.e. perforinas, granzimas e outras proteases, para a interface com a célula alvo, que assim será induzida a entrar em apoptose, por mecanismos dependentes e independentes da ativação das caspases (99, 100). A atividade citotóxica está também ligada a recetores de morte da família do TNF, concretamente à via Fas–Fas L. Apesar de complementar a atividade dos grânulos citotóxicos, a ligação destes recetores é de particular importância na terminação da resposta imunitária, contribuindo em especial para a eliminação de células imunes ativadas (101).

Uma nova janela tem vindo a ser aberta recentemente na abordagem das células T CD8 e da sua diferenciação. Assim, surgem cada vez mais evidências de que também estas células assumem perfis distintos, caracterizados de acordo com o tipo de citocinas que produzem (102). Tal como as suas congéneres Th, as populações de células Tc1 (produtoras de IFN- γ e TNF- α), Tc2 (produtoras de IL4 e IL13) ou Tc17 (produtoras de IL17) ganham agora relevo no papel de auxiliaadoras, inclusive das funções T CD4 (102). E mesmo as populações menos representadas de células Th, como as células Th9 e Th22, parecem encontrar paralelismo em subpopulações de células Tc (Tc9 e Tc22). Estende-se ainda esta plasticidade de funções às capacidades de regulação, com a existência de células T reguladoras CD8 (103).

1.1.6 Linfócitos T $\gamma\delta$ e células NKT

Encontramos ainda entre os linfócitos, populações chamadas de *innate-like*. Para além das células B1 e das células B da zona marginal (MZ), que serão abordadas mais tarde, destacam-se aqui as células T $\gamma\delta$ e as células Natural Killer T (NKT). Com características de ambas as respostas (inata e adaptativa), estas células juntam a utilização de recetores com formas de reconhecimento inatas com a expressão de TCR (ou BCR – recetor de célula B, no caso das células B referidas), ainda que com diversidade limitada.

De uma forma geral as células T $\gamma\delta$ não expressam os co-recetores CD4 e CD8. Não estão também por isso restritas às vias clássicas de apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC. Estas células secretam uma grande variedade de citocinas, possuindo, em simultâneo, capacidades citotóxicas. Podem dividir-se em células V δ 1⁺, envolvidas na regulação da resposta imune local e na proteção da homeostasia nas mucosas, onde se encontram (nomeadamente na decídua, ou na mucosa pulmonar), e células V δ 2⁺, existentes na circulação periférica (104, 105).

As células NKT são uma população única de células T evolutivamente conservadas, que possuem características quer de células T quer de células NK (106, 107). De acordo com o seu TCR estas células dividem-se maioritariamente em três grupos (106, 108, 109). As células NKT do tipo 1 possuem um repertório restrito de TCR $\alpha\beta$, em que a cadeia α é invariante (V α 14-J α 18 em humanos), pelo que são também chamadas de NKT invariantes ou iNKT. A cadeia β do TCR é preferencialmente V β 11 em humanos (110). A apresentação de antígenos está restrita à molécula CD1d, uma molécula não clássica de MHC de tipo I, cujo ligando prototípico é um glicosíngolípido de uma esponja marinha: α -galactosilceramida (α -GalCer) (110). As células NKT do tipo 2 também são restritas à molécula CD1d, mas apresentam um repertório de TCR diverso. As células NKT do tipo 3 estão restritas a outras moléculas de MHC (classe I e II) que não a molécula de CD1d (110). Tal como as células T $\gamma\delta$, as células NKT secretam diferentes citocinas, logo após estimulação do seu TCR, o que confere a estas células uma importante atividade reguladora sobre as respostas imunológicas, apesar de representarem um valor quase residual em circulação, ou na decidua (110).

1.1.7 Innate lymphoid cells

Há ainda a acrescentar as novas populações descritas como células linfóides da resposta inata (*Innate lymphoid cells*, ILCs). As ILCs são uma pequena fração das células da resposta imune, que se encontram distribuídas por tecidos imunes e não imunes, aparentemente diferenciadas a partir de um progenitor linfóide comum (111). Apesar de caracteristicamente espelharem os

fenótipos e funções das células Th, estas células linfoides, por se desenvolverem precocemente, não possuem a maquinaria de recombinação somática, que lhes permitiria exibir um recetor de superfície como o TCR ou o BCR. Portanto, não têm especificidade para antígeno, nem sofrem igualmente processos de seleção clonal e proliferação após estímulo, como acontece com as células da resposta adaptativa. Contudo, respondem rapidamente a estímulos secretando as respetivas citocinas, que vão modular também a continuação da resposta imune (112). Atualmente consideram-se três grupos de ILCs. O grupo 1 inclui as ILC1 e as células NK, com expressão dos fatores T-bet e/ou Eomes, e produção de IFN- γ . Estão envolvidas na resposta contra agentes intracelulares, promovendo ativação das células fagocíticas. No grupo 2, as ILC2 são células dependentes dos fatores GATA3 e *retinoic receptor related orphan receptor- α* (ROR α), com capacidade de produção de citocinas Th2, como a IL4, a IL5 e a IL13. São por seu lado células que se relacionam com a resposta a parasitas, aumentando os níveis séricos de IgE e interagindo com mastócitos, basófilos e eosinófilos. Finalmente, no grupo 3, encontram-se as ILCs ROR γ t+ e as células LTi (*lymphoid tissue inducer*), por sua vez produtoras de IL17 e IL22. Também aqui se vê paralelismo com a resposta Th equivalente, estando as ILCs do grupo 3 vocacionadas para proteção contra infeções extracelulares por fungos e bactérias. Para isso, exercem funções de ativação e recrutamento de neutrófilos e indução de respostas imunes ao nível dos epitélios. De forma importante as células LTi vão relacionar-se com os processos de formação dos nódulos linfáticos (111-113).

1.1.8 A Ativação do Linfócito B

Olhando agora para a versão B da resposta adaptativa, encontramos as células B à periferia após o seu processo maturativo na medula óssea (MO). Ao contrário do que foi postulado durante muito tempo, a célula B parece sair da medula óssea não como célula madura, mas antes num estadio imaturo, que completa a maturação nos órgãos linfoides secundários, e em especial no baço (114). É exatamente a expressão de IgM que altera a expressão génica da célula B imatura, direcionando a sua saída da MO. No baço, estas células B, chamadas de transição, vão sofrer episódios de seleção de repertório, que condicionarão a sua transformação em célula B naïve (115). Vários marcadores têm sido apontados como diferenciadores dos diferentes estadios das células de transição, que contudo parecem manter uma expressão forte de CD24 e CD38 (116), até se diferenciarem em células não auto-reativas maduras, com co-expressão de IgM e IgD (uma característica, aliás, exclusiva da célula B naïve madura, alcançada por mecanismos de *splicing* alternativo) (117). Fatores de sobrevivência, como o *B cell activating factor* (BAFF), vão ser fundamentais nesta fase do desenvolvimento B (118). As células B naïve maduras podem encontrar-se em localizações distintas, o que permite a sua distinção em células B foliculares, células da zona marginal e ainda células B-1. Ao nível das cavidades pleurais e peritoniais encontramos as células B-1, às quais se associa a expressão de CD5, e que têm um processo de desenvolvimento aparentemente distinto das restantes subpopulações B (119). Classificadas como *innate-like*, dada a limitada diversidade dos seus recetores, estas células, capazes de se autorrenovarem, estão sobretudo associadas a respostas timo-independentes, produzindo preferencialmente anticorpos naturais, do tipo IgM, nas respostas mais precoces a antígenos bacterianos (120). Tendo em conta a sua localização, as células B MZ da zona marginal do baço estão envolvidas em funções de defesa contra agentes presentes na circulação sanguínea (114). Através da produção de IgM, também de uma forma timo-independente, as células B MZ são

igualmente consideradas *innate-like* (119), tendo sido recentemente descrita a sua forte dependência de fatores comuns à sinalização dos TLR, como o IL-1 *receptor-associated kinase* 4 (IRAK4) (121). As células B MZ são capazes de se diferenciar em plasmócitos de vida curta.

Os folículos dos órgãos linfoides secundários são regiões ricas em células B foliculares (FO), as células B convencionais B-2. Representando grande parte das células B do baço e dos gânglios linfáticos, estas células estão na gênese dos CGs, onde vão suceder-se processos-chave da imunidade humoral adaptativa: a hipermutação somática, a maturação da afinidade e a troca do isótipo (*class switch*). A célula B FO naïve, dispensando a apresentação do antígeno pelas moléculas de MHC, precisa apenas do *crosslink* dos seus recetores pelo antígeno, para iniciar o seu processo de ativação e diferenciação em célula B de memória ou plasmócitos (122). Para além da sinalização do BCR, associam-se nesta fase outros sinais estimuladores como os fornecidos pelo complexo CD21/CD19/CD81, co-recetor do BCR, que se liga a opsoninas, como o fator C3dg, aderidas ao antígeno (123). Ao contrário das suas predecessoras B-1 e MZ, as células B FO respondem maioritariamente a antígenos proteicos, de forma timo-dependente, ou seja, em colaboração com os linfócitos T, sobretudo Tfh (figura 3). Após captar o antígeno, a célula B FO processa-o, e de seguida, apresenta-o nas suas moléculas de MHC de classe II às células Th, que retribuem com a expressão de sinais vitais para a continuação da diferenciação B e da produção de anticorpos (124).

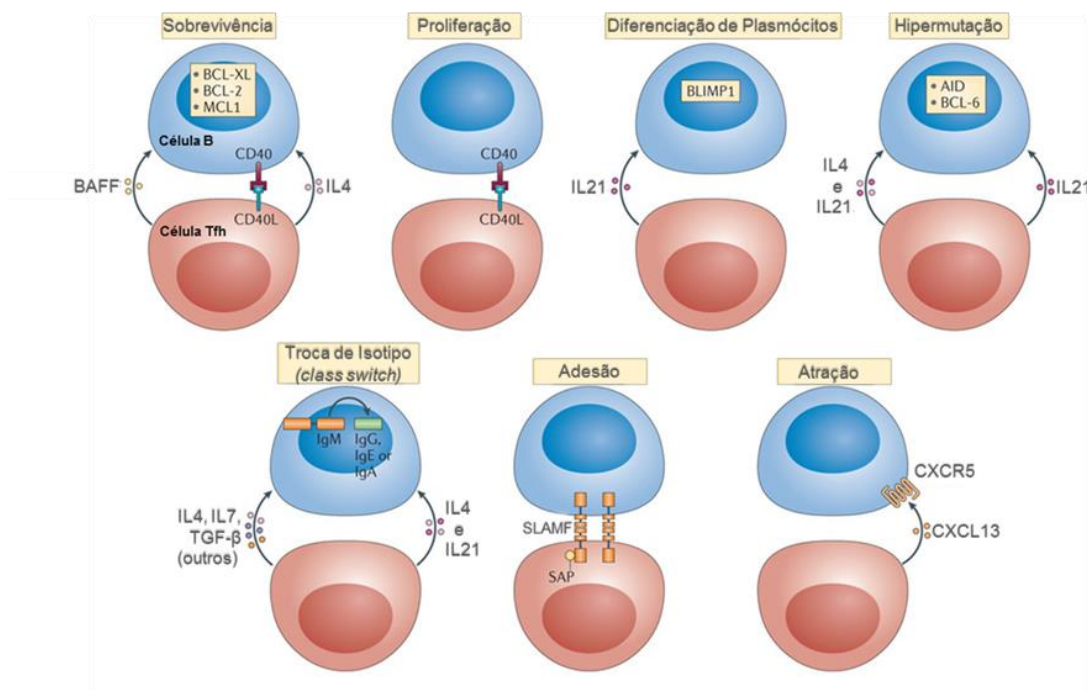


Figura 3 – Cooperação B-T na ativação das células B nos centros germinativos. Adaptado de Crotty e colaboradores (124).

BAFF – *B cell activating factor* / Fator ativador da célula B, TGF- β - *Transforming growth factor* / Fator de transformação de crescimento.

Apesar de não estar completamente esclarecido no humano, no modelo animal estão bem caracterizadas as fases subsequentes à ativação B. Inicialmente, há uma reação extrafolicular,

independente de IL21, que leva à formação de células com diferenciação intermédia (entre a célula naïve e o plasmócito), de vida curta, e capacidade de secreção de anticorpos de alta afinidade, os plasmablastos (125). Nesta fase, células com menor afinidade para o antígeno vão migrar para os CG. Pela ação da IL21, a proliferação dos centroblastos na zona escura do CG, vai dar continuidade a processos de hipermutação somática, a que se segue a maturação de afinidade dos centrócitos, cuja seleção será mediada por células dendríticas foliculares (FDCs) ao longo da zona clara do CG (114, 119). A ligação CD40-CD40L, já abordada como importante na ligação entre célula Th e DC, e agora revisitada na ligação entre célula Th e célula B, é muito importante para troca do isótipo (126, 127). Mas, como mostra a figura 3, a interação T-B tem várias vias, nomeadamente com a produção de citocinas pelas células Th a modular a classe de imunoglobulina a produzir pela célula B em diferenciação (124). Corroborando a orquestração entre os diferentes braços da resposta imune, encontramos evidências de indução da produção de IgE (e também de IgG4), por citocinas Th2, como a IL-4 e a IL-13, todos importantes mediadores na resposta a infeções parasitárias e respostas alérgicas (128, 129). Relações semelhantes encontram-se entre IgA e TGF- β , e eventualmente entre IgG1 e IgG3 e a citocina IFN- γ (perfil Th1), sobretudo em modelo animal (130, 131).

Após a conclusão dos processos da reação do CG, teremos plasmócitos de vida longa, que se vão estabelecer na MO continuando aí a produção de anticorpos (122), e também células B de memória, que após ciclos continuados de divisão, vão apresentar recetores de alta afinidade para o antígeno agressor (132). É atualmente aceite que o compartimento B de memória assume várias populações celulares, com as células B de memória CD27⁺ a desenvolverem-se nos CGs, e as células B de memória CD27⁻ preferencialmente a originarem-se no baço ou na lamina própria, no caso de serem células B de memória CD27⁻IgA⁺. Do CG saem também células B de memória positivas para IgM e plasmócitos secretores de IgM, apesar do *class switch*, existindo igualmente vias independentes dos CGs capazes de gerar células B de memória com *class switch* (116). Estes dados sugerem mecanismos alternativos para a diferenciação B.

1.1.9 A Função Reguladora do Linfócito B

Quando se aborda a regulação da resposta imunitária, sobretudo a nível periférico, o foco cai inevitavelmente nas populações de células Treg e nos mediadores imunológicos a elas associados. No entanto, do ponto de vista celular, a regulação da resposta imune não é da exclusiva responsabilidade das células T reguladoras, e assistimos hoje a um interesse crescente da comunidade científica pelo papel que as células B desempenham a este nível. Tradicionalmente estudadas no contexto da produção de anticorpos e da apresentação de antígenos, e geralmente com funções de estimulação da resposta imune, as células B parecem ser elementos fundamentais também na regulação das respostas imunológicas.

Apesar de se reportarem já nos anos 50 algumas associações entre deficiências de células B e manifestações autoimunes (133), só nos anos 70 se propôs pela primeira vez uma função supressora ou reguladora para as células B, avançando-se nesta altura, com a hipótese de esta capacidade B ser mediada por anticorpos inibidores (134-137). Alguns destes estudos propuseram mesmo que, ou as células B, ou os seus produtos, eram responsáveis pela supressão de reações cutâneas de hipersensibilidade retardada em modelos animais. Mais tarde, pela mão de Janeway e colaboradores (138) abriu-se definitivamente a porta para o estudo do papel supressor dos linfócitos B, quando pela primeira vez, num modelo animal de esclerose múltipla

(EAE – encefalomielite autoimune experimental), se descreveu a exacerbação da doença em ratinhos deficientes em células B (ratinhos μ MT). Considerando-se, a partir daqui, o efetivo papel supressor das células B, nasceria finalmente o conceito de “célula B reguladora” (Breg), usado pela primeira vez em 2002 (139). Reunindo resultados de anos de investigação nesta área, com evidências de que as células B conseguem conter e limitar respostas inflamatórias excessivas, a tabela 2 sumariza alguns dos marcos mais importantes no reconhecimento da função reguladora nas células B.

Tabela 2 – Perspetiva histórica das células B reguladoras. Adaptado de Mauri e colaboradores e Rosser e colaboradores (140, 141).

Ano	Ratinho	Humano
1974	Células B suprimem hipersensibilidade retardada	
1996	Desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE) crónica em modelo sem células B.	
2002	Células B produtoras de IL10 regulam autoimunidade; Células B CD19 ⁺ CD1d ^{hi} produtoras de IL10 controlam colite associada a resposta Th2.	
2003	Células B ativadas por antígeno e CD40 previnem artrite induzida por colagénio.	
2004	Células B produtoras de IL10 induzidas por helmitas protetoras contra anafilaxia.	
2007	Células B CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} IL10 ⁺ previnem desenvolvimento de artrite induzida por colagénio; Células apoptóticas induzem células B reguladoras; Supressão de EAE mediada por células B que requer a indução de células Treg por moléculas co-estimuladoras B7.	Produção diminuída de IL10 por células B em pacientes com esclerose múltipla; Depleção de células B parece aumentar a quantidade de células Breg funcionalmente competentes dentro da população B em doentes com lúpus eritematoso sistémico.
2008	Células B ativadas por TLR suprimem EAE através da inibição de respostas Th1/Th17.	Células B CD1d ^{hi} induzidas por helmitas e produtoras de IL10 melhoram parcialmente esclerose múltipla.
2009	Células Breg induzidas por GIFT15 suprimem EAE.	
2010	Células Breg previnem artrite induzida por antígeno através da indução de Tregs.	Células Breg CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} produtoras de IL10 suprimem a diferenciação de células Th1; Células B10 suprimem a produção de citocinas por monócitos; Aumento de células B CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} IL10 ⁺ associado a <i>outcome</i> favorável em doentes com transplante renal.
2011	A produção de IL10 por células Breg é regulada por sensores de cálcio STIM1 e STIM2; Células B produtoras de IL10 induzem células Treg e inibem células Th1/Th17 durante inflamação aguda; Células B inibem resposta antitumoral através da libertação de TNF- α .	
2012 2013		Células Breg CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} induzem Treg, suprimem respostas Th1 e Th17, suprimem respostas T CD8 específicas para vírus; e estão diminuídas em doentes com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistémico; Células Breg CD19 ⁺ CD25 ^{hi} CD71 ^{hi} produtoras de IL10 e IgG4, identificadas no sangue periférico.
2014		Células Breg CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ^{int} suprimem células dendríticas e células T CD4 ⁺ efetoras

Breg – células B reguladoras, EAE - encefalomielite autoimune experimental, Treg – células T reguladoras, TLR – recetores *Toll-like*.

Contudo, o conceito de célula Breg levanta questões pertinentes para além do simples reconhecimento da função reguladora nas células B. Dos estudos reunidos na tabela 2 (140, 141), é perceptível a disparidade de subpopulações descritas. Em simultâneo, nem sempre as tentativas de se estabelecerem paralelismos entre os fenótipos do modelo animal e do humano, foram convincentes. Alguns aspetos colocam as subpopulações de células Breg relativamente próximas de outros subgrupos B, por exemplo, a ativação das células Breg ser via CD40, como acontece com a generalidade das células B. A própria IL10, apontada como agente efetor mais evidente da função Breg, é também um fator de crescimento que promove a diferenciação de células B em plasmócitos.

Recentemente tem vindo a ser sugerido que, mais do que uma população bem definida, se reconheçam funções reguladoras em diferentes subpopulações de linfócitos B (140, 141). À semelhança do Foxp3 para as células Treg, a identificação de um fator de transcrição regulador especificamente para as células Breg ou o estabelecimento de um fenótipo de consenso, seria altamente relevante para condicionar a sua identificação e o estudo diferenciado das suas funções e capacidades. Ainda assim, são atualmente apontadas algumas populações como potenciais nichos de células Breg no humano (e também no ratinho) tal como se expõe na tabela 3 (116, 142-145). No humano, chamam particularmente a atenção as subpopulações de células de transição CD24^{hi}CD38^{hi} e de células B10 CD24^{hi}CD27⁺. As primeiras, com forte secreção de IL10 quando ativadas pela ligação do recetor CD40, foram capazes de suprimir a diferenciação Th1 e Th17, mostrando ainda potencialidade na conversão de células T CD4 em células Treg. As células B10, também através da IL10, suprimem a produção de TNF- α pelos monócitos, respondendo normalmente à estimulação com lipopolissacárido bacteriano (LPS) e oligonucleótidos CpG. Ambas têm vindo a mostrar alterações funcionais e quantitativas em várias patologias (145).

Tabela 3 – Principais populações de células B reguladoras. Adaptado de Mauri e colaboradores e Rosser e colaboradores (140, 141).

Células Breg	Ratinho	Humano	Caraterísticas principais
Células T2-MZP	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi}	-	Presentes no baço, produzem IL10, induzem células Treg e suprimem células T CD4 e CD8 efetoras.
Células MZ	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁻	-	Presentes no baço, produzem IL10, induzem células Treg e suprimem células T CD4 e CD8 efetoras.
Células B10	CD5 ⁺ CD1d ^{hi}	CD24 ^{hi} CD27 ⁺	Presentes no baço (ratinho) e sangue (humano), produzem IL10 e suprimem células T CD4 efetoras, monócitos e DCs.
Plasmócitos	CD138 ⁺ MHC-11 ^{lo} B220 ⁺	-	Presentes no baço, produzem IL10 e IL35 e suprimem células NK, neutrófilos e células T CD4 efetoras.
Células B Tim-1⁺	Tim-1 ⁺ CD19 ⁺	-	Presentes no baço (ratinho), produzem IL10 e suprimem células T CD4 efetoras.
Plasmablastos	CD138 ⁺ CD44 ^{hi}	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ^{int}	Presentes nos nódulos linfáticos (ratinho) e no sangue (humano), produzem IL10 e suprimem DCs e células T CD4 efetoras.
Células imaturas	-	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	Presentes no sangue e em locais de inflamação, produzem IL10, induzem células Treg, suprimem células Th1 e Th17, resposta específica de vírus de células T CD8, mantêm a homeostasia de células iNKT.
Células Brl	-	CD19 ⁺ CD25 ^{hi} CD71 ^{hi}	Presentes no sangue e produzem IL10 e IgG4.

Breg – células B reguladoras, DCs – células dendríticas, MZ – zona marginal, T2-MZP – precursores de transição 2 da zona marginal, Treg – células T reguladoras.

1.2 A Resposta Imune Alérgica

Como qualquer resposta imunitária, a resposta alérgica começa com um contacto com o alérgénio. Há contudo nesta resposta um processo com três fases: a sensibilização, a reação de hipersensibilidade imediata e a reação tardia.

Na fase de sensibilização, começam sobretudo as interações entre DCs e o alérgénio que se encontrará nas mucosas, em doses baixas, após atravessar a camada epitelial. Com a migração das DCs para os órgãos linfoides secundários, o alérgénio, no contexto das moléculas de MHC de classe II das DCs, vai ser então apresentado e promover a ativação de linfócitos T CD4 naïve, que vão diferenciar-se como células Th2. As células Th2, através do seu *output* citocínico (IL4, IL5, IL13), vão promover, entre outras funções, a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE específica para o alérgénio contactado. Na membrana de células como o mastócito, o basófilo ou o eosinófilo, encontram-se recetores de alta afinidade para a IgE (FcεRI). Assim, as IgEs produzidas em resposta ao primeiro contacto com o alérgénio ficarão ligadas a estas células, ricas em mediadores pró-inflamatórios.

No segundo contacto do mesmo alérgénio, teremos uma reação de hipersensibilidade imediata. Assim, na submucosa, o alérgénio poderá ligar-se às IgE pré-formadas, presentes na superfície de mastócitos, basófilos ou eosinófilos. Isto porque, estas imunoglobulinas reconhecem especificamente o alérgénio, numa reação antigénio-anticorpo. Havendo aglutinação dos FcεRI pelas moléculas de IgE a eles ancoradas na superfície celular, as células são ativadas e promove-se a sua desgranulação. Nos grânulos das células efectoras encontram-se mediadores pré-formados (histamina) e derivados dos fosfolípidos de membrana (serotonina, leucotrienos, prostaglandinas), que serão assim libertados para o tecido. Entre si, estes mediadores têm efeitos variados, dos quais se destacam vasodilatação, contração do músculo liso e promoção da inflamação das mucosas. De acordo com a localização do contacto com o alérgénio teremos manifestações na pele (eczema atópico), nasoculares (rinoconjuntivite alérgica) ou brônquicas (asma alérgica), entre outras, conforme esquematizado na figura 4.

Nas mucosas, a produção de citocinas Th2 vai favorecer em paralelo a síntese de IgE (IL4), a diferenciação da linhagem eosinofílica na medula óssea, e vai contribuir para a posterior ativação dos eosinófilos pela ação da IL5. A IL-13 é um agente direto da hipersensibilidade brônquica, que causa, por exemplo, a contração dos epitélios e das células do músculo liso das vias respiratórias.

A inflamação alérgica vai ser mantida numa ação conjunta entre mastócitos, células Th2 e células epiteliais da zona em causa, através da secreção de citocinas e quimiocinas, que vai caracterizando a resposta alérgica. Mais linfócitos, basófilos e eosinófilos, bem como, neutrófilos e macrófagos serão recrutados para o local onde se mantém a inflamação. A importante acumulação de eosinófilos nas mucosas inflamadas vai promover a sua ativação e consequente secreção de quimiocinas pró-inflamatórias (146). A desgranulação destas células, ao libertar ECP e MBP, vai ter um efeito citolítico rompendo a integridade dos epitélios. É a desregulação na rede complexa de interações celulares e moleculares, bem com a frequência da exposição ao alérgénio, que vai portanto levar ao desenvolvimento da doença atópica crónica.

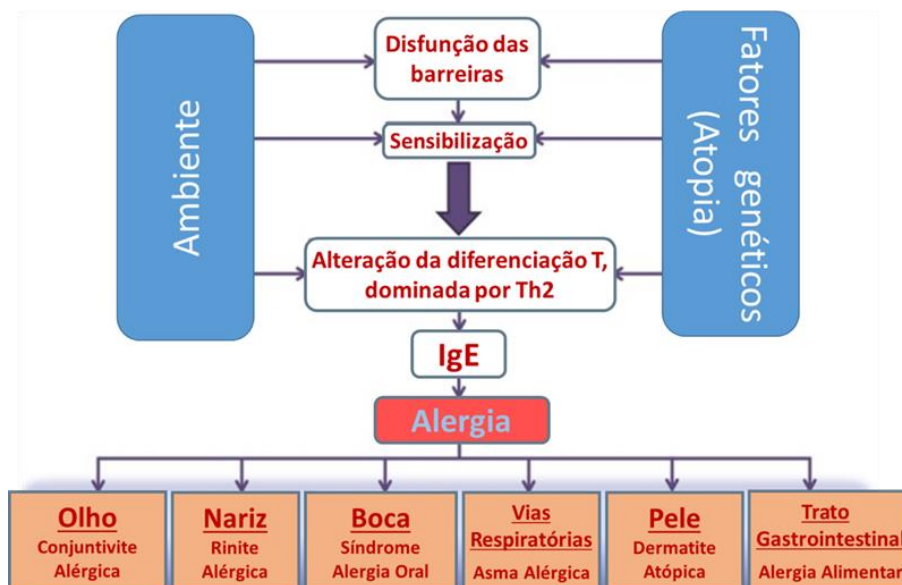


Figura 4 – O desenvolvimento das respostas alérgicas. A integridade das barreiras é afetada por um conjunto de estímulos ambientais e fatores de predisposição genética, permitindo episódios de sensibilização a alérgenos ambientais. Nos indivíduos atópicos, a resposta vai assumir sobretudo um perfil de diferenciação Th2, com produção de IgE, que irá mediar a resposta alérgica nos tecidos e órgãos onde se encontre. Adaptado de Portelli e colaboradores (147).

1.2.1 Células T e Alergia

A plasticidade do linfócito T CD4 permite perfis de diferenciação vários, como acima descrito, com as citocinas produzidas por cada uma destas populações celulares a assumir funções distintas na fisiopatologia da resposta alérgica. Abordando desde logo o perfil pró-alérgico Th2, tem sido documentada a heterogeneidade de subpopulações incluídas dentro deste grupo. Concretamente, identificaram-se células produtoras de IL4 e IL13, mas também células em que se acrescenta a produção de IL5, num eventual processo de diferenciação a partir das células IL4⁺ IL13⁺. Isto porque se encontra expressão de IL4 em células de memória central e células de memória efetoras, enquanto a expressão de IL5 se limita a estas últimas. A função diferencial da IL5, com o recrutamento e promoção da diferenciação eosinofílica, poderá conferir, às duas subpopulações Th2, papéis diferentes na patogénese das doenças atópicas (148).

Também na população de células Th2 foram incluídas células produtoras de IL9. No entanto, uma nova população celular foi caracterizada e classificada como Th9, justamente por produzir IL9, mas sem produção das citocinas chave do perfil Th2. Ainda assim, há indícios de que as células Th9 se diferenciem a partir das células Th2 (81). A frequência das células Th9 correlaciona-se diretamente com os níveis séricos de IgE em indivíduos alérgicos (149), e verificou-se igualmente que a produção de IL9 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas com anti-CD3 se encontra aumentada em crianças atópicas, quando comparadas com crianças não atópicas (83). Vários estudos em modelo animal têm vindo a associar esta população celular com processos alérgicos. Nomeadamente, a IL9 produzida por células Th9 parece causar inflamação das vias respiratórias, com expansão nestes tecidos de populações como os eosinófilos, associando-se a neutralização desta citocina, com anticorpos anti-IL9, à redução da hipersensibilidade brônquica (83). Por outro lado, a exposição a alérgenos parece promover a acumulação pulmonar de células Th9, com secreção de IL9, e sem IL10, IL13

ou IFN- γ (149). Polimorfismos no gene da IL9 e dos seus recetores foram também associados a um risco aumentado para eczema atópico numa população coreana (150). Mais estudos são necessários, sobretudo no humano, para uma melhor compreensão das funções das células Th9 e da IL9 como elementos efetores concretos nas patologias atópicas.

Uma outra população T recentemente identificada, a população Th22, tem ganho importância na atopia, sobretudo no contexto do eczema atópico. Apesar de também poder ser produzida pelas células Th17, IL22 é a citocina que caracteriza a população Th22, que a produz de forma independente da IL17. No entanto, IL22 e IL17 atuam de forma sinérgica promovendo outras citocinas pró-inflamatórias nos epitélios brônquicos (115). Ainda assim, a IL22 é menos pró-inflamatória que a IL17, e parece ter mesmo funções imunoprotetoras, apesar de esta duplicidade não estar ainda completamente compreendida. Nos processos crónicos de asma alérgica, e também na inflamação crónica do eczema atópico, a IL22 está caracteristicamente elevada (151), sendo a sua fonte sobretudo a população Th22, e não a população Th17 (152). Tendo em conta a sua localização e as suas (ainda pouco conhecidas) funções protectoras e regeneradoras das barreiras epiteliais da pele e do pulmão (153), as células Th22, através da regulação da produção da IL22 podem vir a ser alvos primordiais para a modulação das doenças inflamatórias dos epitélios, como é o caso do eczema atópico.

Diversas subpopulações de células T têm sido associadas a processos alérgicos, como é o caso das células Th17 (154). A IL17, e indiretamente as células Th17, estarão implicadas na promoção da asma alérgica (155). Em asmáticos, atópicos e não atópicos, ocorre em paralelo com a migração de eosinófilos para o pulmão, recrutamento e ativação de neutrófilos (156). Estes dados sugerem um papel para as células Th17 e para a IL17 na inflamação alérgica (157, 158). A IL17 coordena o influxo de granulócitos (sobretudo neutrófilos) nos modelos de inflamação alérgica das vias respiratórias (159). Em linha com a presença de neutrófilos, a concentração de IL17 encontra-se moderadamente aumentada no tecido pulmonar, lavado broncoalveolar, esputo induzido e soro, de doentes com asma (atópicos ou não) (160). Em relação à asma alérgica, também se encontram níveis elevados de células Th17 circulantes em comparação com controlos saudáveis. Estas células, assim como os níveis pulmonares de IL17, tendem a aumentar com a gravidade da doença, aumentando igualmente os valores plasmáticos de IL17 e IL22 (161). Curiosamente, apesar de presentes nas manifestações agudas do eczema atópico, a presença de células Th17 está francamente diminuída na doença crónica, comparativamente a outras condições alérgicas crónicas. O mesmo acontece com os neutrófilos (151). Para além de as células Th17 produzirem IL17, também os eosinófilos segregam esta citocina, apresentando inclusive uma maior produção de IL-17 em indivíduos asmáticos (162, 163). Por seu lado, a própria IL-17 parece interferir com a produção de eotaxina pelos epitélios, sendo esta molécula um elemento major para o recrutamento e ativação dos eosinófilos (164, 165).

Em relação ao perfil Th1, tem sido aceite que o desvio da resposta imune para este perfil possa ser um elemento de proteção para asma e para as doenças alérgicas em geral, uma vez que as células Th1 antagonizam as funções e a diferenciação das células Th2 (166, 167). Assim, observam-se melhorias na asma alérgica em indivíduos com infeções que despoletem a resposta Th1 (168-172) ou mesmo diminuição das manifestações atópicas em doentes com patologias em que há reforço da resposta Th1, como é o caso da esclerose múltipla (173). É sobretudo ao IFN- γ , citocina que marca o perfil Th1, que se têm atribuído as funções que contrapõem a

resposta Th2, quer a nível sistémico, quer localmente, nas mucosas das vias respiratórias (174). A comprová-lo, estudos demonstraram que o IFN- γ atua nos epitélios das vias aéreas inibindo a sintomatologia das doenças alérgicas (174), e mais ainda, o bloqueio desta citocina permite reverter a inibição exercida pelas células Th1 contra a hipersensibilidade brônquica mediada pela resposta Th2 (175). Ainda que muito menos representadas, também se encontram células Th17 e Th1 específicas de alérgenos numa resposta alérgica, e não apenas células do perfil Th2 (176). Concretamente, células Th1 específicas de alérgeno parecem, de facto, contrapor a hiperreatividade brônquica e a inflamação eosinofílica promovidas pelas células Th2, através da ação do IFN- γ que produzem (175).

No entanto, nem sempre se tem comprovado esta ação inibitória ou protetora do perfil Th1 para as doenças alérgicas (177-179). Na realidade, as respostas Th1 e Th2 parecem poder colaborar uma com a outra, por exemplo para agravar a inflamação das vias aéreas (177, 180), havendo mesmo evidências de que a presença de células Th1 seja um requisito para o recrutamento das células Th2 após contacto com o alérgeno em modelo animal de asma alérgica (181). Aliás, neste modelo animal estudado é possível observar o co-recrutamento das duas linhagens para o ambiente pulmonar. O paradigma Th1/Th2 na asma alérgica, para além de ser complementado com a diversidade de subpopulações celulares Th já descritas, parece assim mais complexo, com o papel das células Th1 e do IFN- γ a assumir contornos menos claros do que se imaginava. Por exemplo, apesar de a expressão do fator de transcrição T-bet se encontrar diminuída em doentes asmáticos, foram já associados ao IFN- γ eventos como o agravamento da condição asmática e o desenvolvimento de hiperreatividade brônquica (182, 183). É também aceite que algumas condições, como a presença de IL12, possam induzir células Th2, já estimuladas por alérgenos, a produzir IFN- γ (184). Estes achados propõem que as células Th2 possam ser modificadas e repolarizadas para o chamado perfil Th0, menos diferenciado, e foram mesmo comprovados processos semelhantes *in vivo* na sequência de imunoterapia específica em doentes alérgicos (97).

Por fim, as chamadas células T polifuncionais, ou seja, células T produtoras de vários tipos de citocinas, têm sido frequentemente avaliadas. Foram entretanto identificadas células específicas de alérgenos com coprodução de citocinas Th1/Th2, Th2/Th17 e Th1/Th17. Na asma, a população mais prevalente parece ser a população Th2/Th17 (185, 186). Olhando para estas variações parece plausível que venhamos a identificar várias combinações destes subtipos celulares associados a diferentes fenótipos alérgicos.

Assim, considerando todas as implicações das populações celulares já abordadas, onde se reúnem também abordagens próximas para as células T CD8 (187), tem vindo a juntar-se evidência da natureza heterogénea e complexa das doenças atópicas, e em particular da asma, onde vários elementos imunes orquestram e são orquestrados nos seus processos fisiopatológicos (188).

1.2.2 Células T reguladoras e Alergia

A alergia, por definição, traduz uma reação de hipersensibilidade mediada pelo Sistema Imunitário, podendo estar implícita ou não a produção de IgE (189). Neste contexto, a atopia surge então como a tendência pessoal e/ou familiar para a produção de anticorpos da classe E, dirigidos contra estímulos ambientais, conhecidos como aeroalérgenos (189, 190).

A hipótese higiénica assenta na ideia de que o desenvolvimento das doenças alérgicas tem uma relação inversa com o contacto com agentes infecciosos na primeira infância. Quando propôs esta explicação para o aumento da incidência das doenças alérgicas, Strachan, a partir da observação de estudos epidemiológicos sobre rinite alérgica, defendeu que as infeções na infância promovidas pelo contacto não-higiénico com irmãos mais velhos, ou adquiridas na fase pré-natal a partir da mãe que contacta com os seus filhos mais velhos, podem conferir proteção para o desenvolvimento de doenças atópicas (191). O percurso das doenças atópicas ao longo da história reforça esta ideia. Do ponto de vista da higiene, medidas como a erradicação das infeções por helmintas ou a introdução do tratamento das águas, surgem na Europa e nos Estados Unidos da América em meados do século XIX em paralelo com os registos iniciais de rinite alérgica. A doença, que começou a manifestar-se em classes socioeconómicas mais elevadas, acabou por se tornar epidémica no início do século XX. Também a asma, com crescimento continuado a partir de 1960 parece ser concomitante com a maior presença das crianças no interior dos edifícios, o que terá alguma relação com a sensibilização a alérgenos interiores (192). Por outro lado, a hipótese higiénica é suportada também por observações epidemiológicas que associam um risco diminuído para o desenvolvimento de doenças atópicas a exposições não higiénicas como sejam: famílias numerosas, um número elevado de irmãos, estilos de vida mais tradicionais e rurais, contacto com animais domésticos, ou a frequência de infantários (193-196).

As células T reguladoras têm sido apontadas também como estando envolvidas na prevenção de alergia e atopia.(197) Na última década têm vindo a considerar-se as células Treg como agentes activos na prevenção de respostas Th2 em indivíduos saudáveis, associando-se uma limitação funcional das células Treg aos doentes alérgicos (198). Há contudo resultados diversos na sua abordagem. No contexto das doenças atópicas, Hoffmann e colaboradores não documentaram diferenças na população de células T CD4⁺CD25^{Hi} no sangue periférico entre adultos asmáticos e grupo controlo (122). Porém, foi já documentado um aumento das células T reguladoras em asmáticos nas exacerbações da doença (199) e também uma diminuição das células T reguladoras em crianças asmáticas não tratadas com corticosteroides, quando comparadas com crianças asmáticas tratadas (200). Por outro lado, outros estudos têm igualmente descrito alterações ao nível das populações de células T reguladoras no sangue do cordão em crianças com risco elevado para a ocorrência de doenças alérgicas e atópicas (201, 202). Doentes com boa resposta à imunoterapia apresentam diminuição da expressão de IL4 e da razão IL4/IFN- γ , acompanhando-se de uma manutenção das respostas Th1 e Treg (203). Trabalhos recentes parecem indicar ainda que, na asma alérgica, há diminuição da expressão de Foxp3 e que as funções supressoras das células Treg CD25^{Hi} se encontram diminuídas (200, 204, 205). Curiosamente, algumas infeções por parasitas, que se associam a um menor risco de doença alérgica, têm aumento dos níveis de células Treg infiltradas nos nódulos peribronquiolares (206).

É importante salientar ainda que algumas estratégias terapêuticas para as doenças atópicas, como os corticosteroides, atuam nas células Treg promovendo o aumento da produção de IL10 e o aumento de expressão de Foxp3. Também os broncodilatadores de longa ação (LABA) atuam promovendo a função das células Treg. Várias estratégias de imunoterapia específica têm vindo a ter sucesso, verificando-se, nestes doentes, que um dos elementos que condiciona a sua efetividade é a supressão das células Th2 pelas células Treg (207).

Considerando as populações Treg e iNKT no contexto da atopia, as células Treg têm sido implicadas na resolução de situações inflamatórias associadas à asma, enquanto às células iNKT CD4⁺ tem sido apontado o efeito oposto (208). Nguyen e colaboradores (208) documentaram entretanto uma citotoxicidade aumentada das células iNKT contra células Treg em doentes com asma alérgica, relacionando esta interação com a gravidade da doença, com promoção indireta de um perfil inflamatório Th2.

No fundo, as células Treg e as células iNKT são subpopulações de células T que podem, independentemente, regular as respostas imunitárias inata e adaptativa. Defende-se atualmente que as células iNKT ativadas possam modular quantitativamente e qualitativamente a função das células Treg, por mecanismos dependentes da IL-2, e em simultâneo, as células Treg poderão suprimir a proliferação, a libertação de citocinas e a citotoxicidade das células NKT por um mecanismo dependente do contacto célula a célula (209). Assim, importa perceber em que locais ocorre esta interação iNKT-Treg, como é possível modulá-la e quais os efeitos desta interação em diferentes circunstâncias.

A figura 5 sumariza as principais subpopulações de células T CD4, e a sua relação com as respostas alérgicas.

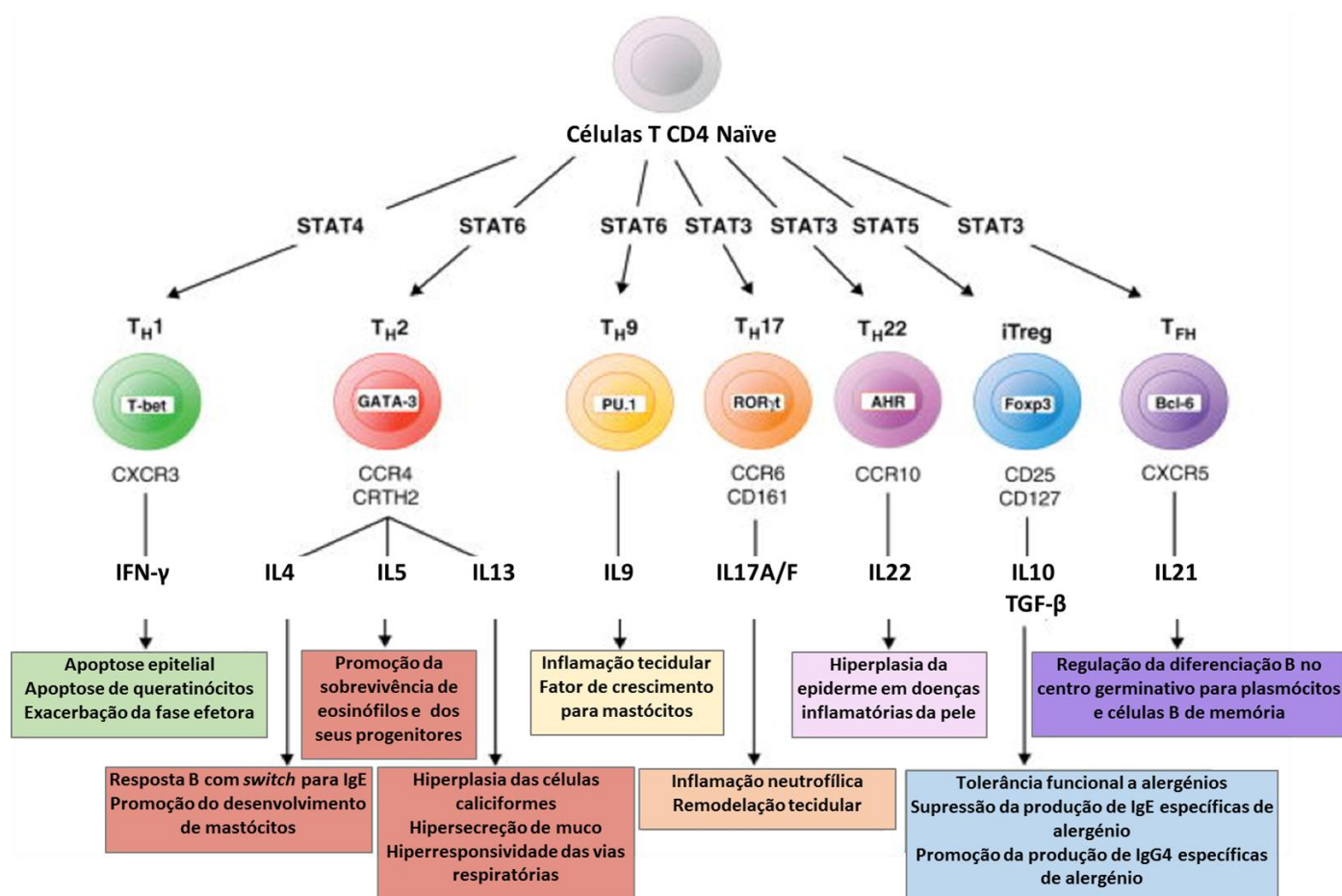


Figura 5 – Subpopulações de células Th e o seu contributo para a resposta alérgica. Adaptado de Wambre e colaboradores (176).

TGF-β - *Transforming growth factor* / Fator de transformação de crescimento, Treg – Células T reguladoras.

1.2.3 Células B e Alergia

As células Th2, e em particular as células Tfh com perfil Th2, induzem a produção de IgE específica de alérgeno pelas células B, e durante muito tempo foi este o papel atribuído à linhagem B no contexto da atopia (210, 211). Pelo contrário, as células B foram muito abordadas, com diferentes estratégias de classificação, e com aplicações terapêuticas no âmbito das doenças autoimunes, onde se percebeu que apresentam perfis distintos, quer na circulação quer nos órgãos linfoides secundários (116, 212, 213). Em mulheres asmáticas não grávidas (214) e em crianças atópicas (215) foram descritas contagens elevadas de células B. A presença em circulação de elevadas proporções de células B imaturas, em concreto células B CD5⁺, normalmente presentes no compartimento CD24^{Hi}CD38^{Hi}, no primeiro mês de vida, foi apontada como um fator preditivo de atopia durante a infância (216). Os mesmos autores relacionaram ainda os compartimentos B naïve e de memória com o BAFF, estando contudo este fator de regulação B diretamente correlacionado com as células B de memória, e inversamente correlacionado com as células B imaturas e naïve. Níveis elevados de BAFF no nascimento também se associam positivamente com a exposição materna a ambientes rurais (216). Os níveis de BAFF foram igualmente estudados no contexto das doenças atópicas, encontrando-se aumentados em doentes com asma e rinite alérgica (217, 218).

Há, no entanto, escassez de resultados no que se refere à distribuição de subpopulações no compartimento B em doenças atópicas. Sobretudo, têm sido abordadas as células B produtoras de IgE. Recorrendo a modelos animais foi possível identificar células B de memória e plasmócitos produtores de IgE, apesar de ser controversa a diferenciação destas células, com autores a apontar vias dependentes e vias independentes dos CGs (219-222). Apesar de marcada ligação da atopia à produção de IgE, em modelo animal de asma alérgica, foi possível encontrar após exposição a aeroalérgenos, a presença de plasmócitos de vida longa a secretar IgE, mas também IgG e IgA específicas (223). Após exposição a aeroalérgenos fúngicos foi também relatada, em modelo animal, a alteração de populações de células B pulmonares, que evidenciaram impacto na produção de anticorpos. De facto, este estudo reportou aumento da população de células B2 no pulmão, com identificação de células produtoras de anticorpos, uma observação que se fez acompanhar de aumento na presença de IgA, IgG e IgE no soro e no lavado broncoalveolar em ratinhos alérgicos (224). Recentemente, as células B foram implicadas no próprio desenvolvimento de respostas Th2 e de processos inflamatórios nas vias aéreas (225, 226). A apresentação de antígenos pelas células B também promove as respostas Th2, verificando-se ser sobretudo importante em doenças pulmonares alérgicas (227). Acrescenta-se, ainda, que células B estimuladas por citocinas são uma importante fonte de IL17A e IL17F, podendo desta forma participar ativamente em mecanismos imunes, inclusive no contexto atópico de forma independente da produção de anticorpos (228).

As recentemente descritas células B reguladoras, trouxeram um novo fôlego à abordagem das células B, em particular nos indivíduos atópicos (229-231). No ratinho, muitas doenças autoimunes e alérgicas foram suprimidas por células B10 produtoras de IL10 (231-233), mas são necessários mais estudos para precisar as características e funções das células Breg, particularmente no humano. As suas potencialidades estendem-se nomeadamente ao desenvolvimento de terapias específicas para as doenças alérgicas, à luz do que acontece já com outras populações reguladoras (234, 235). Apesar da falta de consenso na abordagem fenotípica destas células, as células Breg, jogadores recentes na arena alérgica, mostraram uma atividade

reguladora diminuída na asma alérgica (236), mas provaram ter efeitos benéficos no controlo da inflamação das vias respiratórias em modelos animais, em proximidade com a ação das células Treg, que são capazes de recrutar (232). O papel das células Breg na regulação da inflamação alérgica é também reforçado por estudos que apontam que a ausência de células B aumenta a hiperreatividade e a inflamação das vias respiratórias em modelos de indução de asma alérgica por esfingosina cinase/ esfingosina 1 fosfato (S1P) (237). Recentemente, a percentagem de células Breg CD24^{Hi}CD27⁺ em doentes com rinite alérgica, e sobretudo em doentes com rinite e asma alérgica, mostrou-se diminuída, em comparação com indivíduos saudáveis (236, 238), no entanto relatou-se ainda o aumento da população Breg CD24^{Hi}CD38^{Hi} em asmáticos sem terapêutica instituída (236).

Mais estudos são necessários para avaliar as subpopulações B periféricas na asma (239).

1.2.4 Citocinas na Alergia

As citocinas são proteínas imunomoduladoras importantes na sinalização celular, que medeiam complexas redes de interação entre células das respostas inata e adaptativa, desempenhando um papel crucial na regulação da inflamação alérgica das vias respiratórias. Os indivíduos atópicos, ao contrário dos não atópicos, apresentam um predomínio do perfil Th2 com produção de IL4, IL5, e IL13, mas também IL6, IL10, e IL31 (240-246). Apesar de tradicionalmente se considerarem as citocinas Th2 como os elementos centrais da orquestração alérgica (sobretudo IL4, IL5 e IL13), encontramos outros mediadores com impacto na asma e na rinite alérgica, destacando-se recentemente a IL9, IL17, IL22, IL25 e IL33 (247). Assim, revisitando o clássico paradigma Th1/Th2 na doença alérgica, expande-se a outras famílias de células T, através sobretudo das respetivas citocinas, a explicação dos mecanismos fisiopatológicos da inflamação e das manifestações alérgicas. Aparentemente, alguns destes mediadores são também produzidos por células epiteliais, como é o caso de linfopoietina do estroma tímico (TSLP), IL33 ou IL25, com ações importantes na remodelação das vias respiratórias (248). O aumento destas citocinas resulta na ativação de células Th2, mastócitos, DCs, eosinófilos, e basófilos, conduzindo à inflamação alérgica (249). O reconhecimento de novos elementos com impacto na resposta alérgica assume-se também como ponto atrativo do ponto de vista do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Tem sido possível documentar alterações nos perfis citocínicos em doentes atópicos. Vários estudos têm vindo a apontar o aumento significativo dos níveis séricos de IL4 em asma atópica, um parâmetro que parece correlacionar-se positivamente com as concentrações de IgE (250, 251). No entanto, em crianças com asma ligeira a moderada não se verificaram alterações séricas nos níveis de IL4 (252), o que sustenta alguma ligação entre os níveis de IL4 e o controlo da asma. Mais recentemente, os níveis séricos de IL4 encontraram-se significativamente aumentados em crianças asmáticas, sem tratamento prévio com corticoides, em relação a crianças saudáveis. Porém, estes valores não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre asmáticos tratados com corticoides e controlos (253), o que traduz também a modulação que as terapêuticas promovem no perfil citocínico sistémico. Ao nível dos valores séricos de IFN- γ , não se verificou este efeito da terapêutica, com as crianças asmáticas, tratadas e não tratadas, a apresentarem valores séricos diminuídos em relação aos controlos. A severidade da doença parece ter uma relação importante com o *milieu* citocínico. As concentrações séricas de IL4, IL5 e IL13 apresentaram valores mais elevados na asma grave, em

relação a doentes controlados. Mais ainda, a obstrução brônquica parece correlacionar-se inversamente com os níveis de IFN- γ , mas positivamente com os níveis de IL5 (254).

Por outro lado, o IFN- γ mostrou ter um papel importante na exacerbação de inflamação alérgica pré-existente, uma vez que funciona como um ativador de eosinófilos. Em doentes com asma grave aguda, os níveis séricos desta citocina parecem aumentados, e com uma maior presença de células produtoras de IFN- γ a acompanhar a infiltração eosinofílica na asma grave aguda (255). Da experimentação animal, tem sido possível também provar que a IL17A, e possivelmente a IL17F, controlam a acumulação de neutrófilos, a secreção de muco, ou a reatividade do músculo liso. Em concreto para a IL17A, foi reconhecida a relação entre um aumento local desta citocina e a gravidade da doença na asma alérgica (256). Em termos de concentrações séricas, foram recentemente reportados níveis elevados de IL17 e IL33 em doentes asmáticos, que em paralelo evidenciaram valores mais baixos de IL10 do que controlos saudáveis (257). Uma vez mais, o efeito da terapêutica pode condicionar estes achados, já que agentes como o montelucaste provaram uma ação promotora dos níveis séricos de IL10 (258).

Em relação aos perfis de produção de citocinas, vários estudos têm já abordado esta matéria. Prescott e colaboradores (259) encontraram diferenças subtis na produção de determinadas citocinas após estimulação com ácaros entre crianças com e sem risco de alergia (definido pela história familiar de alergia). Neste estudo, a expressão de mARNs de IFN- γ , após estimulação policlonal, estava diminuída nas células mononucleares do cordão umbilical de crianças com alto risco para alergia quando comparadas com crianças com baixo risco para alergia. A existência de doenças alérgicas aos seis anos de idade estava ainda relacionada com uma elevada expressão de mARNs de IL-5, em células mononucleares do sangue periférico (no primeiro ano de vida), após estimulação com alérgénios. Mais recentemente foram igualmente encontrados níveis elevados de células Th2 produtoras de IL4 em doentes com asma alérgica, nos quais se observou também aumento de produção de IL17, e uma aparente diminuição das células Treg e dos níveis plasmáticos de IL10. Estes dados reforçam não só a ideia do desequilíbrio Th1/Th2 no doente com asma atópica, mas complementam este mecanismo com falta de equilíbrio também entre as respostas Th17 e Treg (260).

1.3 O Paradigma Imunológico da Gravidez

1.3.1 Gravidez: Tolerância e Regulação

Durante o período de gestação, a mulher grávida vai ser exposta a antigénios estranhos, os antigénios paternos expressos pelo feto. Para o sucesso da gravidez, a resposta imunitária materna contra os antigénios paternos terá de ser regulada, pelo menos até ao momento do parto. Num paralelismo com a Imunologia da transplantação, na gravidez, o sistema imunitário evita a rejeição de um elemento semi-alógeno, o feto, encontrando-se no parto pré-termo mecanismos imunológicos similares aos observados nos processos de rejeição de órgãos (261). Supõe-se assim a presença de mecanismos de tolerância durante a gravidez, sem que o sistema imunitário materno descure as suas funções protetoras perante agressões infecciosas, mantendo as suas normais atividades de vigilância. Na realidade, o próprio feto deverá também ser protegido pelo sistema imunitário materno durante a gestação (262).

Classicamente, a tolerância imunológica representa a ausência de rejeição e a presença de uma coexistência entre dois organismos, assumida de forma sistémica. Contudo, a grávida não é absolutamente tolerante aos antígenos fetais, como sugerem estudos em modelo animal, onde tecidos fetais transplantados fora da zona uterina são de facto rejeitados, sem que se altere a viabilidade dos embriões até ao fim da gravidez (263). A existência de células T maternas contra aloantígenos paternos (188) corrobora também estas ideias, supondo-se então que a sua ativação e atuação estejam controladas por processos de regulação temporal (e espacial) impostos durante a gravidez (263). Por outro lado, o próprio sistema imune fetal tem de ser capaz de limitar a ação destas células maternas, capazes de atravessar o casulo de trofoblastos fetais. Mais ainda, uma mãe “imunotolerante” estaria suscetível ao eventual ataque de células imunes fetais que por sua vez transpusessem a barreira placentária. Esta rede complexa de elementos de regulação tem levado ao conceito alternativo de simbiose tolerante entre mãe e feto (264, 265).

Efetivamente, a anatomia da interface materno-fetal, onde se desenvolvem barreiras físicas entre mãe e feto, como a placenta e saco amniótico, não evita que decorram várias interações locais e sistémicas entre os dois sistemas imunitários (266). Imediatamente após a implantação, começa a invasão do endométrio pelo trofoblasto. A diferenciação do endométrio no tecido especializado da decídua vai conferir um local de ancoragem para a camada trofoblástica da placenta, que vai adaptar-se às várias fases da implantação do embrião, garantindo a adequada nutrição fetal (266). Desde muito cedo, o trofoblasto vai contactar localmente com células do estroma decidual, mas também com células NK (células NK uterinas, uNK), macrófagos, linfócitos T $\gamma\delta$ e Treg, já presentes no endométrio e que vão limitar a progressão da invasão trofoblástica. Após o estabelecimento da circulação placentária, também as vilosidades trofoblásticas passarão a estar em contacto com o sangue materno, trocando nutrientes, e podendo mediar alterações sistémicas na resposta imune materna (266).

Esta interação, local e sistémica, tem também significado nos processos de tolerância e regulação. A este nível impõe-se a referência ao MHC. Em humanos, a região génica do MHC localiza-se no braço curto do cromossomo 6, e é a região mais polimórfica do genoma. Estes genes do sistema HLA no humano codificam as principais moléculas encarregadas da apresentação de antígenos na superfície celular. Encontramos na classe I, as moléculas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C. Também existem as chamadas moléculas não clássicas, onde se contam HLA-E, HLA-F, HLA-G, HFE, MHC *class I polypeptide-related sequence* A (MICA) e B (MICB). Com exceção das duas últimas moléculas, todas as restantes formam heterodímeros com a cadeia invariante β 2-microglobulina. Todas as células nucleadas e as plaquetas expressam moléculas de MHC de classe I na sua superfície, envolvidas nos processos de discriminação próprio/não próprio. Entre o complexo MHC de classe II, encontramos os genes que codificam as moléculas de HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, e ainda HLA-DM e HLA-DO. Estes elementos são fundamentais para a regulação da resposta imunitária, através da sua expressão predominantemente em células apresentadoras de antígeno, que medeiam os processos de ativação dos linfócitos (267).

Carateristicamente, o trofoblasto fetal expressa as moléculas não clássicas de MHC de classe I, HLA-E, HLA-F e HLA-G, e ainda HLA-C, na ausência das restantes moléculas clássicas de MHC de classe I e II (268). É interessante notar que esta alteração no padrão de expressão confere capacidades únicas ao trofoblasto na proteção do feto, como acontece com a molécula de HLA-

G, que para além de expressa, é segregada pelo trofoblasto. Capaz de se ligar a recetores LIR (*leukocytes immunoglobulin-like receptors*) presentes em células uNK, macrófagos, e linfócitos T, a molécula de HLA-G induz a inativação destes leucócitos. Na realidade, quimiocinas e outras moléculas supressoras produzidas pelo trofoblasto são de importância crucial na modulação da resposta na interface materno fetal, como esquematicamente representado na figura 6.

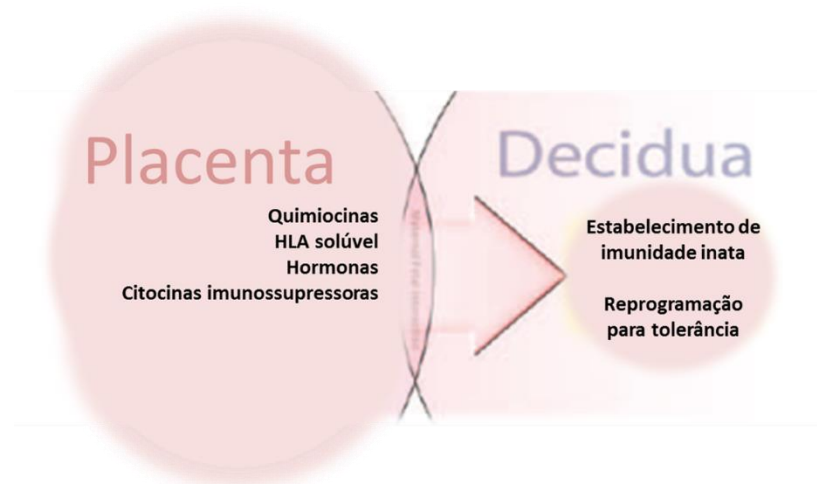


Figura 6 – Interação imunológica na interface materno-fetal. Adaptado de Hunt e colaboradores (265).

Um outro mecanismo importante para o sucesso da gravidez é a expressão no trofoblasto do ligando do recetor Fas (FasL), que se associa a vias indutoras de apoptose. Consequentemente, a presença deste ligando no trofoblasto vai promover a apoptose das células T maternas ativadas que aí expressem o recetor Fas, decorrendo assim mais um mecanismo de regulação da resposta materna.

A gravidez parece assentar num desvio da resposta imune para um perfil Th2, com um forte componente anti-inflamatório, para a qual contribuem também interações reguladas entre o sistema imune materno e o sistema imune fetal (269). Citocinas Th2 produzidas ao nível do interface materno-fetal contribuem de igual modo para a manutenção da gravidez (270, 271). Como anteriormente referido, tem vindo a ser postulado que mais do que um desvio da resposta para o perfil Th2, a gravidez assume mecanismos reguladores que equilibram a produção de citocinas (272). Por um lado, não se reportaram eventos abortivos em ratinhos deficitários na secreção de citocinas Th2, obtidos por manipulação genética (273). Em paralelo, citocinas tipicamente Th1, como IFN- γ ou TNF- α , têm um papel importante no desenvolvimento da placenta (274), mas, a ocorrência de abortos espontâneos foi apontada em situações com predomínio de resposta Th1 (275, 276). São frequentemente relatadas associações entre a resposta Th1 e pré-eclampsia ou ocorrência de partos pré-termo (270, 277). Alguns estudos têm abordado já as células Th17 na gravidez, com resultados contraditórios, reportando ora números semelhantes das células Th17 circulantes em mulheres grávidas e não grávidas, ora valores mais elevados na gravidez (274). No entanto, as células Th17, bem como o tipo de respostas que gerem, parecem ter também a sua cota parte na ocorrência de abortos espontâneos (278, 279). E, se associadas, as respostas Th17 e Th1 podem representar uma combinação com efeitos ainda mais negativos no curso da gravidez. A manutenção da tolerância materno-fetal é assim

recorrentemente associada aos efeitos reguladores da resposta Th2, mas sobretudo a mecanismos impostos pelas células Treg (280-282).

Desde a sua descoberta há cerca de 30 anos, as células Treg abriram uma nova página em vários campos da imunologia, e em particular na manutenção da gravidez, sobretudo no seu início. Um dos principais modelos atualmente aceites para a evolução das células Treg ao longo da gravidez está representado na figura 7.

O início da gestação é acompanhado por uma subida importante das células reguladoras, que aumentam quer na circulação quer no útero (283). A expansão clonal de células Treg periféricas e uterinas, juntamente com a presença de células uNKs e DCs tolerogénicas, garantem a tolerância do feto até ao parto. Concretamente, estes mecanismos vão ser importantes para regular, durante a gravidez, as células T citotóxicas, no sentido de se evitarem respostas contra as células fetais, mantendo-se o normal estado de alerta contra agentes patogénicos (284). O aumento e posterior normalização das células Treg durante a gestação é seguido da persistência de células reguladoras de memória após o parto, que vão manter a tolerância para os antígenos fetais paternos. Numa gravidez subsequente, mantendo-se o progenitor masculino, as células Treg de memória proliferam rapidamente dando sequência aos processos de regulação da nova gravidez (285).

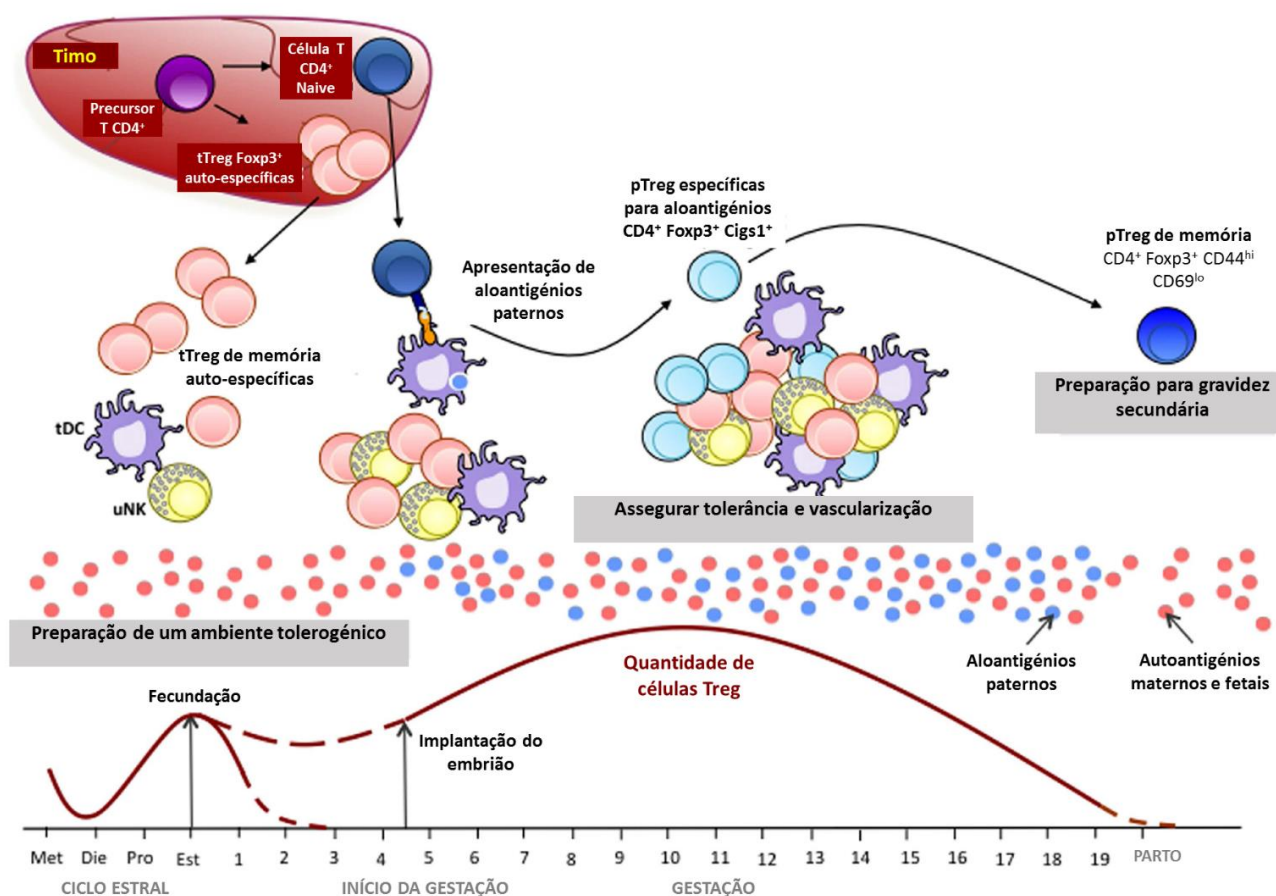


Figura 7 – Evolução das células T reguladoras ao longo do ciclo estral e da gestação do ratinho. Adaptado de Ruocco e colaboradores (283).

pTreg – Células T reguladoras periféricas ou induzidas, tTreg - Células T reguladoras naturais ou tímicas.

Também os linfócitos Breg parecem implicados no processo de tolerância materno-fetal, verificando-se o seu papel na manutenção da imaturidade das DCs e no suporte da expansão das células Treg. Estas células mostraram-se capazes de controlar processos abortivos em modelos animais com tolerância imunológica comprometida, fortalecendo a sua relação com a manutenção do equilíbrio imunológico na gravidez (286). Considerando que a gonadotrofina coriônica humana (β HCG) promove a produção de IL10 nas células B, que o estradiol expande a população Breg e que se encontram nestas células recetores para hormonas esteroides (287), pode inferir-se também um papel regulador das hormonas sexuais femininas ao longo da gravidez e a sua interação com as células Breg. O potencial regulador das células Breg tem vindo a ser estudado no âmbito da sua aplicabilidade a estratégias terapêuticas para patologias obstétricas (287).

As propriedades imunorreguladoras das hormonas da gravidez, em particular da progesterona, do estradiol, e da β HCG, estão envolvidas de forma crucial no sucesso do estabelecimento, manutenção e finalização da gravidez. Carateristicamente, durante a gravidez, assiste-se a uma flutuação nos níveis séricos destas hormonas. No primeiro trimestre da gravidez há um domínio da β HCG. Inicialmente produzida pelo trofoblasto, a β HCG sobe de forma significativa até à 11.^a semana de gestação, diminuindo lentamente a partir daí, de forma progressiva, até ao fim da gestação. A β HCG induz, por seu lado, a produção da progesterona durante a gravidez (288). Inicialmente produzida também pelo trofoblasto, mas sobretudo pela placenta a partir da 9.^a semana de gestação, a progesterona verá os seus níveis séricos subir ao longo da gravidez. Atingindo o seu valor máximo no fim da gestação, a concentração sérica de progesterona irá diminuir cerca de 5 a 6 dias após o parto (288-291). Uma flutuação semelhante é observada nos níveis séricos de estrogénios, como o estriol e o estradiol, que sobem ao longo da gravidez, e são igualmente produzidos pela placenta (289). Apesar de produzida pela hipófise, também a prolactina vai aumentar ao longo das semanas de gestação. Contudo, havendo após o parto estimulação das glândulas mamárias promovida pela amamentação do bebé, os níveis séricos de prolactina mantêm-se elevados, ao contrário do que se observa para progesterona e estrogénios após o parto (291).

Como supracitado, existem evidências da modulação da resposta imunitária pelo milieu hormonal caraterístico da gravidez. Entre as hormonas referidas, encontram-se funções que promovem vias de tolerância, tais como a redução da capacidade de apresentação de antigénios (em DCs, monócitos e macrófagos), o bloqueio da ativação de células NK, T e B, e ainda a indução de células T reguladoras. Ao nível da interface materno-fetal, parecem igualmente importantes para a proliferação das células uNK e das DCs tolerogénicas (292-294). No início da gravidez, a β HCG estará envolvida no recrutamento de células Treg para a placenta, e parece promover também a diferenciação Th2, induzindo a produção de IL4 pelas células T ativadas, em detrimento da produção de IFN- γ (295, 296). Por outro lado, a presença de progesterona e estrogénios poderá também regular os perfis de diferenciação T. Através da limitação da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo macrófago, ou da inibição da ativação do fator de transcrição NFkB (fator nuclear kappa B), a progesterona parece impor efeitos negativos à diferenciação Th1, sendo atualmente aceite que esta hormona promove as células Th2 e Treg, limiando as ações Th1 e Th17 (288, 297). Para os estrogénios, porém, encontram-se efeitos diversos sobre a diferenciação T, sobretudo dependentes da concentração da hormona, com a possibilidade de conduzirem por exemplo à produção de IFN- γ , ou à secreção de IL10 (298). Para

os níveis elevados de estradiol observados na gravidez, em particular, no terceiro trimestre, são, sobretudo, a inibição do perfil Th1 e o favorecimento da diferenciação Th2 que são apontados como efeitos da hormona (297). Em simultâneo, também se atribui aos estrogénios a capacidade de promover a expansão e a função das células Treg, e de limitar a ativação das células T efetoras (299-301). A prolactina, contudo, vai surgir no fim da gravidez e no período pós-parto (em mulheres a amamentar) como um cariz mais pró-inflamatório. Assim, encontram-se entre as ações da prolactina sobre o sistema imunitário a estimulação da produção de citocinas como IFN- γ , IL-12 e IL-10, bem como a promoção da proliferação das células T (288, 302).

Em suma, os efeitos reguladores das hormonas da gravidez incluem-se numa rede complexa de interações com os elementos da resposta imunitária, essencial para o sucesso da gravidez.

1.3.2 Gravidez e Atopia

Na perspetiva da resposta imunitária, as semelhanças entre gravidez e atopia são consideráveis. A manutenção do perfil Th2, associada à interface materno-fetal, é igualmente observada no contexto da atopia. Esta proximidade imunológica desde cedo animou a comunidade científica, no sentido de compreender o impacto das doenças atópicas na gestação e o impacto da gravidez na doente atópica.

Portanto, podemos falar em implicações na gravidez do fundo atópico da mulher. Durante a gravidez, as mulheres atópicas apresentam limitação da produção IFN- γ e IL10 em resposta a aloantígenos fetais e paternos (303-305). Mas, este condicionamento funcional é observado também em outras respostas (a micobactérias, outros agentes bacterianos e virais), corroborando então a ideia da alteração sistémica da resposta imunitária (306-309). Considerando a predisposição da mulher atópica para o perfil Th2, poder-se-ia racionalizar algum benefício nestas mulheres, do ponto de vista reprodutivo. De facto, alguns estudos têm vindo a documentar nestas mulheres taxas de fertilidade mais elevadas, menor tempo de espera para engravidar (310, 311), e idades gestacionais mais elevadas, com risco mais baixo de partos pré-termo (202, 312-314). Apesar disto, no reverso da medalha, encontramos evidências de que mulheres com asma grave apresentam um risco aumentado para partos pré-termo, pré-eclampsia, baixo peso à nascença e necessidade de cesariana, em especial se estas mulheres não se encontrarem sob terapêutica (315, 316). Em suma, para a mulher em idade fértil, as doenças atópicas, e de modo particular a asma, podem apresentar riscos importantes na gravidez, sobretudo se não controladas.

O desvio Th2 da resposta imunitária na gravidez pode interferir com as doenças atópicas e modificar o seu curso. O eczema atópico sofre agravamento das manifestações em cerca de 50% das mulheres, embora ainda se reportem melhorias associadas à gestação numa franja considerável de doentes (aproximadamente 25%) (317). A ocorrência de sintomas nasais é frequente nas mulheres grávidas, mas a rinite alérgica parece ter um *outcome* variável com a gravidez, podendo melhorar ou piorar, com uma grande percentagem de mulheres a relatar contudo não sofrer alterações ao normal curso da doença durante a gravidez (318). Quanto à asma alérgica, a gravidez afeta o seu curso normal, embora durante a gravidez, as alterações ao curso da doença não sejam iguais em todas as asmáticas. Apesar de algumas limitações e disparidades metodológicas nos estudos que o suportam, o paradigma atualmente aceite contempla que cerca de um terço das mulheres asmáticas melhora, outro terço piora, e as

restantes não apontam variações significativas nas manifestações clínicas da doença no decurso da gravidez (214, 315, 319). Curiosamente, mulheres com formas mais graves de asma antes da gravidez parecem mais predispostas para sofrer um agravamento dos sintomas durante o período de gestação (320-322). De uma forma geral, após o parto, o curso das doenças alérgicas tende a normalizar, voltando ao observado antes da gravidez, embora se reportem exacerbações de eczema atópico no período pós-parto em algumas mulheres (317, 323).

Apesar de não estarem completamente esclarecidas as causas desta variabilidade, têm sido referidos mecanismos imunológicos (níveis de ativação celular, presença de antigénios fetais, ocorrência de infeções no decurso da gravidez), assim como a modulação hormonal, o *stress*, o sexo do bebé ou a obesidade materna (319-322). Fetos do sexo feminino parecem conferir um risco aumentado para complicações de asma na gravidez, ainda que este impacto tenha sido menorizado em estudos mais recentes (324).

Estes fatores não são independentes entre si, sendo documentado que hormonas da gravidez, como o estrogénio e a progesterona, possuem funções de polarização da resposta imune no sentido Th2, bem como capacidade de indução da produção de IgE pelas células B (325). A presença de recetores para estrogénio e progesterona na mucosa nasal e na mucosa brônquica antecipa também que as alterações hormonais da gravidez possam desta forma interferir com o cursar e a sintomatologia atópica (326, 327).

Olhando em concreto para a asma, há a realçar alguns pontos interessantes que podem ajudar a compreender a associação entre mecanismos imunes e endócrinos. As exacerbações acontecem normalmente entre o segundo trimestre e o início do terceiro trimestre; ou seja, o primeiro trimestre e o último mês de gestação parecem livres de crises asmáticas, traduzindo alguma modulação com o decorrer da gestação. Esta ideia vem também ao encontro do facto de, na mesma mulher, o curso da doença ser reprodutível em gravidezes consecutivas, acontecendo no pós-parto a reversão das alterações introduzidas pela gravidez (323).

A noção de que a gravidez agrava a diferenciação Th2 nas doenças atópicas, tem vindo a ganhar ênfase com vários estudos (303-305, 328). No entanto, são necessários mais dados para desvendar a complexa interação celular e molecular a este nível, não só para uma melhor compreensão dos mecanismos imunes na gravidez *per si*, mas também para uma melhor compreensão da realidade da grávida com asma atópica, no sentido de se melhorarem as estratégias preventivas e de terapêutica.

Alterações nos compartimentos circulantes de células T e B têm sido descritas na gravidez em mulheres saudáveis (329-333) e atópicas (334, 335). As exuberantes alterações do *milieu* hormonal da gravidez, em particular no terceiro trimestre de gestação, podem ter capacidades imunomoduladoras, apesar de os resultados de estudos neste âmbito não serem sempre consistentes (301, 336-338). Diferentes estratégias de identificação celular, a avaliação de distintos períodos gestacionais ou a confrontação com modelos animais, com diferenças substanciais em relação à gravidez humana (por exemplo, a distinta modulação endócrina, e o reduzido período gestacional de vários modelos) (339), são possíveis vieses na interpretação dos resultados dos vários estudos (340). Em simultâneo, apesar de existirem várias abordagens para a interpretação das alterações promovidas pela gravidez, o que se sabe acerca do período pós-parto é ainda escasso. Salienta-se que este período, em que observamos normalização das

doenças atópicas para o estadió pré-gestacional, parece evidenciar um segundo episódio de ativação imune depois do grande desafio da gestação (341).

1.3.3 Interações entre Mãe e Filho na Gravidez – O Desenvolvimento do SI

A modulação materna das respostas imunes na criança estender-se-á para além da transmissão genética, devendo considerar-se a importância do período da vida intrauterino para o desenvolvimento do sistema imune fetal. Recorde-se, por exemplo, a proteção conferida ao feto quanto ao risco de atopia, da exposição materna a ambientes rurais (342, 343), o que confirma a importância do período pré-natal para o desenvolvimento futuro de doença na criança. Assim, ainda que a suscetibilidade para atopia seja uma herança genética, a decisão acerca de quando e como se vai desenvolver uma doença atópica é um evento multifatorial. A este nível, os fatores ambientais são determinantes, e dependem do momento em que acontecem.

Reconhecendo na gravidez um predomínio de respostas imunes Th2, as trocas materno-fetais condicionam a exposição do feto a este perfil. Esta exposição, que será talvez mais proeminente em filhos de grávidas alérgicas, poderá ser determinante para o desenvolvimento da resposta imune da descendência. No entanto, no período pré-natal, uma exposição materna adequada a microrganismos, parece estar na génese do efeito protetor dos ambientes rurais, possivelmente relacionada com as importantes vias de sinalização dos TLR (344). Também os efeitos transgeracionais abordados no contexto dos fatores de risco para atopia têm impacto nesta conversa materno-fetal, podendo mesmo associar-se a existência de exposições maternas anteriores ao desenvolvimento de doenças atópicas na criança (345).

Outros estudos têm avaliado a produção de citocinas maternas durante a gravidez (246, 346). De acordo com Kim e colaboradores (346), o desenvolvimento de sibilância e atopia aos três anos de idade estará relacionado com uma resposta Th2 mais forte durante o primeiro trimestre de gravidez. Durante o primeiro trimestre de gravidez, a razão IFN- γ /IL-4 estava diminuída nas mães cujas crianças tinham desenvolvido rinite alérgica, e nas mães cujas crianças evidenciaram sibilância, comparadas com mães de crianças sem rinite alérgica e sem atopia, respetivamente. Não se detetaram alterações na razão IFN- γ /IL-4 nas mães de crianças com e sem asma alérgica, ou nas mães de crianças com e sem dermatite atópica. Contudo, da avaliação de uma panóplia de citocinas onde também se incluíam IL4 e IFN- γ , apenas níveis elevados de IL5 e IL13 no soro materno durante a gravidez, e no leite materno, foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas associados a asma na descendência (347). Aparece também a este nível a influência da exposição a ambientes rurais como promotor das respostas Th1, e das respetivas citocinas (348). Elevadas concentrações no sangue do cordão de IL17, IL5 e MCP-1 (*macrophage chemotactic protein-1*) parecem estar associadas a um maior risco de eczema infantil no primeiro mês de vida em crianças nascidas sem complicações respiratórias significativas (349).

Depois do nascimento, inicia-se a transição Th2 / Th1, que passará a ser a resposta polarizada, por defeito, no sistema imunitário do adulto (350). No entanto, nas crianças com alto risco para atopia, há uma limitação na capacidade de produção de IFN- γ (351, 352), que pode comprometer ou pelo menos atrasar a transição Th2 / Th1, comprometendo uma resposta Th1 competente para alérgenos. No estudo de Tucson (*Tucson Children's Respiratory Study*), a reduzida produção de IFN- γ por PBMCs estimuladas, após o nascimento e aos 3 meses de vida,

estaria associada a um risco elevado de sibilância recorrente no primeiro ano de vida (353). Uma vez mais, parece existir aqui influência materna, já que a sensibilização materna a alérgenos se associa a uma produção mais elevada de IL13 pelas células mononucleares do sangue do cordão (CBMC) da criança, para além de representar, na própria mãe, uma limitação à produção de IFN- γ (354). Da mesma forma, filhos de mães atópicas apresentam concentrações mais elevadas de IgE, bem como uma percentagem mais elevada de basófilos ligados a IgE no sangue do cordão, comparados quer com controlos quer com crianças apenas com história paterna de atopia (355-357).

Em suma, é perentória a influência da gravidez no desenvolvimento do sistema imunitário da criança, e no contexto atópico, parece clara a indução materna preferencial de respostas Th2, e diminuição de respostas Th1. Esta condição será de suma importância, surgindo inclusive a baixa produção de IFN- γ como um fator de risco para o desenvolvimento de atopia. No trabalho de Borrego e colaboradores, crianças com sibilância recorrente e com alto risco de desenvolvimento de asma, definido pela história familiar, apresentavam diminuição da produção de IFN- γ , após estimulação de PBMCs (358).

Foi igualmente observada em crianças, filhas de mães atópicas, uma limitação das funções imunes reguladoras, com evidência de menos células Treg, com restrições funcionais no momento do parto (202). No entanto, há resultados contraditórios, já que outros autores avaliaram a presença de células Treg no sangue do cordão e encontraram mais células Treg em crianças filhas de mães alérgicas, que contudo apresentaram limitações funcionais (menor presença de citocinas reguladoras e menor expressão de Foxp3). Esta limitação funcional poderá facilitar a sensibilização alérgica nestas crianças (359). Em paralelo, parece haver um aumento quantitativo e funcional das células Treg em crianças filhas de mães de ambientes rurais, que parecem ter menor risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas (360). Os níveis de células tTreg no sangue venoso durante a gravidez parecem variar com a exposição a cães e gatos, mas também com a atopia materna (361).

Resultados animadores têm sido descritos em modelos animais, considerando que, após o parto, a exposição a ambientes de estimulação Th1 pode contrapor a influência materna pré-natal, e prevenir a subsequente ocorrência de sensibilização alérgica nas crianças (362).

A possível sensibilização alérgica pré-natal, para aerolergénios, é outro dos mecanismos que pode estabelecer-se entre mãe e feto, apesar de esta influência poder continuar também após o parto, ao longo do período de amamentação (363).

A interface decidual e o leite materno permitirão não só a passagem de alérgenos, mas também de outros mediadores imunes. Os efeitos protetores da passagem de IgG materna para o feto são conhecidos (364), e a existência de trocas celulares entre mãe e filho são também frequentemente reportadas. Em concreto para a asma, a ocorrência deste microquimerismo na criança parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento da doença (365). A transferência de citocinas e quimiocinas maternas para o feto é também um mecanismo possível. Recentemente foi ainda provada a transferência bacteriana para a placenta durante a gravidez, e também a sua presença nas glândulas mamárias (366).

O sistema imune materno poderá assim ter um papel crucial na promoção de um perfil pró-alérgico (Th2) no sistema imune do feto. Apesar de não estarem bem identificados os mecanismos pelos quais ocorre esta modulação intrauterina, ela poderá também ser coadjuvada pela amamentação materna no período pós-natal (362). Foram encontrados valores mais elevados de citocinas como a IL4, IL5, ou a IL13 no leite materno de mulheres atópicas (367), o que pode promover um perfil Th2 e a produção de IgE nas crianças amamentadas (362). Por outro lado, o estudo de Tucson apresentou evidências da proteção conferida pelo aleitamento materno exclusivo para o desenvolvimento de sibilância recorrente aos 2 anos de idade. Paradoxalmente, em simultâneo, este estudo reportou um maior risco de asma e sibilância recorrente aos 6 anos de idade em crianças atópicas, filhas de mulheres asmáticas, se amamentadas com leite materno após o nascimento (368). A disparidade de resultados parece indicar que alguns elementos do leite materno serão protetores, mas outros promotores, da resposta alérgica, revelando também a subjacente complexidade das interações entre o leite materno, o ambiente intestinal e o sistema imunitário em desenvolvimento na criança (362).

1.3.4 Vida Intrauterina e Exposição Fetal a Alergénios

Alguns estudos abordaram a influência do ambiente pré-natal no desenvolvimento de atopia e asma (369-372). Apesar de ser necessária uma exposição repetida para o desenvolvimento da sensibilização, que condicionará a resposta alérgica a um alérgénio, a primeira etapa deste processo pode ocorrer ainda no período pré-natal, surgindo assim o conceito de sensibilização *in utero* (362). De facto, ainda que a placenta, através do sinciotrofoblasto, possa exercer forte contenção à sua passagem (373), a transferência transplacentar e transamniótica de alérgénios foi confirmada com a presença na circulação fetal e no líquido amniótico de alérgénios tais como pólenes e ácaros (373-375). A atestar a funcionalidade do sistema imunitário do feto (ainda que imaturo), encontramos estudos que reportam as CBMCs e PBMCs fetais a responderem a mitogénios a partir da 15.^a e da 16.^a semanas de gestação (376), e a alérgénios após a 22.^a semana (377). No parto, as CBMCs de crianças cujas mães estiveram expostas a alérgénios inalantes durante a gravidez apresentaram maior capacidade proliferativa em resposta a esses alérgénios do que crianças cujas mães não tinham tido exposição. Mais ainda, observaram-se respostas diferenciais para exposições em diversos momentos da gestação. Portanto, o período em que os alérgénios atravessam a placenta pode ser um fator importante para a sua capacidade de ativação das células T e subsequente sensibilização (377).

A exposição pré-natal da mãe a alérgénios inalantes, em particular a ácaros, promove ainda o aumento dos níveis de IgE no cordão umbilical (378). Uma vez que não há passagem de IgE através da placenta, a presença de IgE no sangue do cordão, contra alérgénios, suporta a produção fetal de anticorpos. Concretamente, a IgE do sangue do cordão parece ser um fator preditivo para a positividade de testes cutâneos a aeroalérgénios (379), e, em níveis elevados, foi associada em alguns estudos como um fator de risco para asma aos 10 anos de idade, e para rinoconjuntivite alérgica aos 20 anos (380, 381).

A exposição ao fumo do tabaco durante a gravidez e no período pós-natal pode associar-se ao desenvolvimento de atopia e asma. Em mulheres com exposição passiva ao fumo do tabaco, mas sobretudo com tabagismo ativo durante a gravidez (e mesmo durante o aleitamento), parece ser mais elevado o risco de desenvolvimento de eczema atópico, rinite e asma na descendência (382-384). Entretanto, foi já demonstrado que a exposição ao fumo do tabaco

promove um desvio para a produção local de citocinas Th2, com um aumento dos níveis nasais de IL4, IL5 e IL13, e uma diminuição dos níveis de IFN- γ . Esta exposição leva assim a um aumento da resposta alérgica, com alteração do *milieu* citocínico e subsequente produção de IgEs específicas para aeroalergénios (385). Com recurso a modelos animais foi possível observar que a exposição passiva ao fumo do cigarro durante a gravidez promove igualmente uma polarização para respostas Th2 e para asma alérgica, limitando ou mesmo atrasando o desenvolvimento pulmonar fetal e neonatal, e ainda as respostas Th1 (386). Curiosamente, o conceito de transmissão transgeracional de risco também parece existir para a exposição ao tabaco, que pode, no humano, durar pelo menos 2 gerações. Assim, segundo o estudo de Li e colaboradores, crianças cuja avó materna tenha fumado durante a gravidez das respetivas mães, têm duas vezes mais probabilidade de vir a desenvolver asma. Este risco aumenta ainda mais, caso as próprias mães destas crianças tenham também fumado durante a sua gravidez (345).

Recentemente, a presença de animais em casa (cão ou gato) durante a gravidez foi descrita como estando associada a um risco reduzido para sensibilização a aeroalergénios e para asma alérgica aos 7 anos de idade (387). Esta condição protetora foi estendida à infância, verificando-se que a posse de cães, e sobretudo gatos, nessa fase da vida, estava igualmente associada a um menor risco de atopia, asma, e sibilância (387, 388). A exposição pré-natal a animais da quinta parece também constituir um efeito protetor em relação ao posterior desenvolvimento de alergias. De facto, todo o ambiente rural (visitas a estábulos, celeiros, e contacto com animais da quinta) parece ter uma associação inversa com a prevalência de asma e rinoconjuntivite (342). Sugere-se que a exposição materna a um ambiente rico em compostos microbianos pode conferir, ou pelo menos contribuir para a proteção das crianças, no que concerne aos processos de sensibilização atópica (342).

O próprio parto pode ser um evento importante no desenvolvimento futuro de atopia e doenças alérgicas. A exposição a antigénios neste processo pode induzir a libertação de moléculas bioativas, que podem polarizar as respostas imunes (389). Ao mesmo tempo, vários estudos têm avaliado o impacto dos partos por cesariana, e num estudo recente de meta-análise foi possível identificar um aumento de cerca de 20% no risco de asma em crianças que tenham nascido por cesariana eletiva ou cesariana intraparto, com os autores a atribuírem o aumento da incidência de asma ao aumento, em simultâneo, da taxa de partos por cesariana em todo o mundo (390). O mecanismo subjacente a esta associação parece relacionar-se novamente com a microbiota gastrointestinal da criança, que como vimos, está envolvida na orquestração da maturação e da funcionalidade do sistema imunitário (391). Ora, no parto vaginal, a flora gastrointestinal do bebé vai formar-se preferencialmente a partir da flora vaginal materna. Esta transferência é modulada nos partos por cesariana (392), em que a colonização inicial é feita sobretudo por bactérias da epiderme, em vez da flora de origem vaginal, predispondo as crianças para o posterior desenvolvimento de alergias e asma (391). Recentemente, tem vindo a ser proposta uma colonização bacteriana ainda mais precoce no feto. Ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano foi detetado na placenta, cordão umbilical, líquido amniótico, e mecónio de crianças nascidas de cesariana, sugerindo de alguma forma uma transmissão materno-fetal destes agentes. Esta transmissão foi também comprovada no período pós-natal, onde se verificou a presença de microrganismos como *Lactobacillus reuteri* ao nível do colostro em mulheres suplementadas com probióticos. A exposição microbiana na gravidez pode ter um potencial preventivo no desenvolvimento de doenças alérgicas (393).

Em suma, no período de vida intrauterino, e mesmo no período pós-natal, há fortes indícios de modulação da resposta imune da criança por vários elementos e eventos maternos, salientando-se aqui o ambiente intrauterino, alterações epigenéticas e processos de estimulação microbiana a decorrer nestes períodos, tal como representado na figura 8.

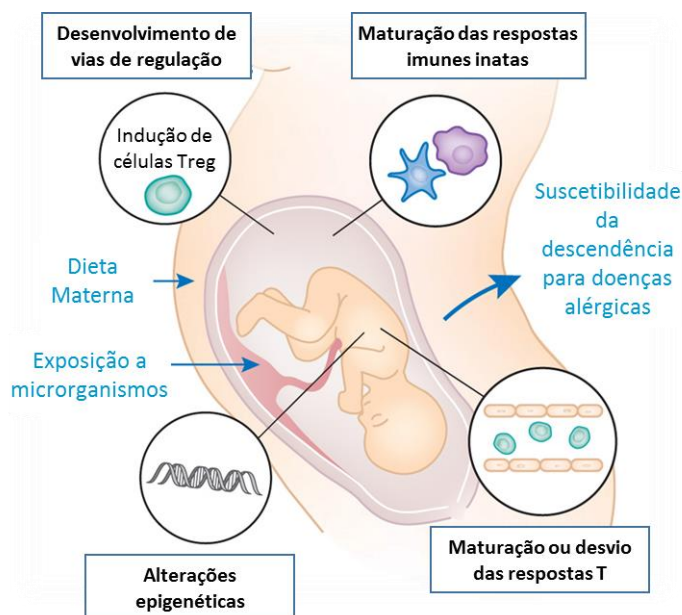


Figura 8 – A influência do ambiente pré-natal no desenvolvimento de doenças alérgicas e atopia. Adaptado de Hawrylowicz e colaboradores (394).
Treg – Células T reguladoras.

1.4 Asma: Conceitos e Definições

1.4.1 Definição e Etiologia

Com descrições que remontam à Antiguidade Clássica, a asma é referida por Homero na sua *Ilíada*, uma obra datada do século VIII a.C.. Segundo a narrativa, um guerreiro, após uma batalha feroz, terá morrido com asma e transpiração. Será esta a primeira referência escrita ao termo asma, cujo significado arrogava dificuldade de respiração, estado ofegante. O verbo grego de que deriva, *aazein*, implica exatamente exalar de boca aberta, arquejar. Foi mais tarde Hipócrates, já no século IV a.C., que usou pela primeira vez asma como termo médico, ainda que não seja claro se esta utilização se referia a um sintoma ou a uma entidade clínica separada. Contudo, os textos hipocráticos atribuem-lhe já um carácter grave, paroxístico, e espasmódico, reportando a presença de expectoração espumosa (395). Estes textos abordam porém vários tipos de doenças neste âmbito, que nem sempre correspondem a entidades nosológicas definidas na medicina moderna.

Segundo o documento mais recente da iniciativa GINA (Global Initiative for Asthma, 2015), a asma é uma doença heterogénea, de etiologia multifatorial, caracterizada por uma inflamação crónica das vias respiratórias, com estreitamento ou obstrução brônquica (396). Clinicamente traduz-se por sinais e sintomas como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse, com variações

ao longo do tempo e variações de intensidade, e ainda limitação variável do fluxo de ar expiratório.

Entre os fatores que desencadeiam a doença podemos encontrar o exercício físico, a exposição a alergénios ou outros irritantes, alterações climáticas ou infeções virais (396).

Quando se identificam mecanismos imunológicos subjacentes ao desenvolvimento da doença, deve esta ser considerada de asma alérgica (190), que na realidade é um dos muitos fenótipos de asma. A asma alérgica surge normalmente na infância, em indivíduos com história pessoal e/ou familiar de doenças atópicas (189).

Na prática clínica, a atopia é justamente considerada na presença de asma, rinite ou eczema, em que se confirma a sensibilização para um alérgénio ambiental, quer pela quantificação de IgEs específicas, quer através de testes cutâneos (*skin prick tests*) (190, 396). Reconhece-se como “marcha atópica” o desenvolvimento de eczema/dermatite atópica (DA) na primeira infância, com o subsequente aparecimento de rinite alérgica (RA) e/ou asma alérgica (AA), ao longo do crescimento da criança (189, 369), como demonstrado na figura 9. As doenças atópicas, e de modo particular a asma, têm importantes implicações socioeconómicas e afetam a qualidade de vida destas crianças e das suas famílias (397-400).

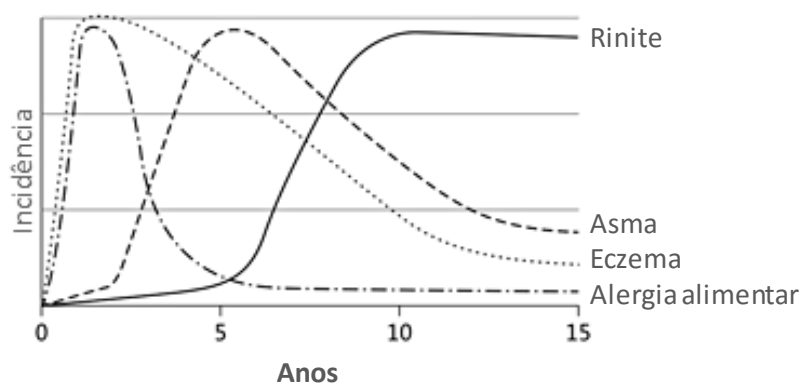


Figura 9 – A marcha atópica: incidência de doenças atópicas do nascimento à adolescência. Adaptado de Barnetson e colaboradores (401).

1.4.2 Prevalência

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um aumento da prevalência das doenças alérgicas, estimando-se que afetem cerca de 20% da população mundial (189), apesar de eventualmente se estar a alcançar uma fase de *plateau* nos países ocidentalizados (192). A “hipótese higiénica”, que associou o desenvolvimento de doenças alérgicas a uma redução da exposição a agentes infecciosos na infância, nasceu da observação de uma menor prevalência de manifestações atópicas (eczema e rinite alérgica, e posteriormente asma) em famílias numerosas (191, 193). Tem sido no entanto postulada a “hipótese da microflora”, que associa alterações na microbiota ao desenvolvimento de atopia (402, 403). De facto, são sobretudo alterações nos fatores ambientais que parecem justificar a rápida elevação na taxa de incidência das doenças atópicas nos últimos anos (147), uma vez que algumas décadas não serão suficientes para que alterações genéticas conduzam a este incremento na prevalência da atopia.

O estudo ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) foi desenhado para permitir comparar a prevalência de asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico em todo o

mundo, usando ferramentas epidemiológicas comuns e harmonizadas na abordagem de cada país. Na fase I, que decorreu entre 1993 e 1995, fez-se a primeira abordagem da prevalência das alergias, com a participação de 56 países e um total de 721.601 crianças, divididas em duas faixas etárias: dos 6 aos 7 anos, e dos 13 aos 14 anos. A segunda fase centrou-se na observação de marcadores específicos para asma e doenças alérgicas num grupo de países mais reduzido (404).

A partir do desenho da fase III do estudo ISAAC, que replica a fase I, com um intervalo mínimo de 5 anos, o objetivo foi avaliar os padrões de evolução temporal na prevalência das doenças estudadas, dando-se particular relevo à associação potencial destas tendências com alterações ambientais desenvolvidas neste período. Esta fase do estudo, que decorreu maioritariamente entre 2001 e 2003, implicou a colaboração de 56 países, e de 498.083 participantes (405).

Em 2004, juntando informação da primeira fase do estudo ISAAC (1992-1996) e de uma investigação anterior (1988-1994) da Comunidade Europeia (*European Community Respiratory Health Survey*, ECRHS), foi possível estimar globalmente as taxas de prevalência de asma, com variações significativas entre diferentes zonas do globo (406). O ISAAC referiu-se apenas às faixas etárias pediátricas, enquanto o estudo do ECRHS foi aplicado em adultos, entre os 20 e os 44 anos. Neste último, reportou-se um valor mediano global de 4,5% (variação entre os 2,0% e os 11,9%). Olhando estes dados, fez-se uma estimativa de que a asma afeta cerca de 300 milhões de indivíduos em todo o mundo, um número que se pensa que virá a alcançar os 400 milhões até 2025 (406).

A fase III do ISAAC apresentou um aumento de prevalência em zonas de menor prevalência inicial. Considerando a ocorrência de sibilância num período de 12 meses, este estudo reportou valores médios da ordem dos 11,6% para crianças entre os 6 e os 7 anos, e 13,7% para adolescentes entre os 13 e os 14 anos (em ambos os casos, os valores subiram ligeiramente em relação ao observado na fase I) (405). Em Portugal, o estudo reportou valores entre os 12,9% para os 6 a 7 anos de idade, e 12,0% para os 13 a 14 anos.

Recentemente, num protocolo desenhado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o *World Health Survey* levou a cabo o maior estudo de monitorização de asma em adultos à escala global (407). Com a Europa a apresentar taxas de prevalência da ordem dos 5,3% de asma clinicamente diagnosticada, e com 49,6% dos indivíduos a reportar sibilância. Portugal ficou-se pelos 8,7% em relação à sibilância, com 7,8% de asma clinicamente diagnosticada.

Seguindo a tendência para a normalização de estratégias, desenvolveu-se também em Portugal o Inquérito Nacional sobre Asma (INAsma), numa colaboração entre a Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica e a Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Dividido em duas fases, este programa pretendeu avaliar a prevalência de asma no país, e de seguida, estimar a proporção de doentes com asma controlada. Resumidamente, reportaram-se prevalências para asma da ordem dos 10,5%, com uma grande percentagem dos indivíduos a ter a primeira crise antes dos 18 anos. Em relação à asma atual, isto é, com pelo menos 3 sintomas nos últimos 12 meses, este valor desceu para os 6,8%, sem diferenças entre géneros (408).

Na gravidez, a asma é a doença respiratória mais comum. Estudos na população norte-americana apontam para que cerca de 18 a 30% das mulheres em idade fértil sofram de doenças alérgicas, particularmente rinite e asma alérgica (409). A prevalência de asma em mulheres grávidas tem vindo a crescer, encontrando-se valores da ordem dos 3,7 a 8,4% na população norte-americana entre 1997 e 2000 (410). Estes valores ascenderam aos 12,4%, com cerca de 8,8% das mulheres a experienciar exacerbações durante a gravidez, na população australiana (315).

1.4.3 Fatores de Risco

De *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) têm surgido várias outras associações entre asma alérgica e diversos genes e polimorfismos, que suportam alterações ao nível dos epitélios, mas também ao nível das respostas imunes inata e adaptativa, como causas da doença (147). O gene *ORMDL3*, associado a suscetibilidade para asma alérgica (411), foi recentemente implicando no recrutamento e desgranulação de eosinófilos (412). Genes como *SMAD3* ou *IL2RB*, que condicionam a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células T, nomeadamente em células pró-inflamatórias e com funções reguladoras, têm também vindo a ser associados com suscetibilidade para asma alérgica (413). O crescente número de genes já identificados, com elevado grau de confiança, como estando associados a maior suscetibilidade para doenças atópicas, suporta assim um forte *background* genético associado a estas doenças (147, 414).

A epigenética terá também uma palavra a dizer neste campo: por um lado, alterações epigenéticas na expressão génica podem ter impacto no risco de desenvolvimento de doença ao longo de várias gerações; por outro lado, as modificações epigenéticas que resultam na asma materna podem ser transmitidas à descendência (415).

Recordando o conceito de marcha atópica, crianças com eczema atópico sensibilizadas para alérgenos ambientais entre os 2 e os 4 anos de idade, apresentam um risco aumentado de progredir para rinite e asma alérgica, em relação a crianças com eczema não atópico. Aliás, entre os principais fatores de risco para progressão e persistência de asma encontramos a sensibilização atópica, bem como a manifestação precoce de eczema atópico e a sua gravidade (189). A própria rinite alérgica é também um fator de risco para o desenvolvimento de asma. Doentes com rinite alérgica têm um risco consideravelmente superior de desenvolver asma quando expostos a aeroalérgenos, como pólenes ou epitélios de animais domésticos, do que doentes sem rinite. A rinite pode mesmo preceder a asma na marcha alérgica (189).

Dos resultados dos estudos epidemiológicos abordados, é perceptível a variabilidade na prevalência da asma e das doenças alérgicas, podendo postular-se que esta variação geográfica se deva a uma interação entre a componente genética da doença, e uma grande variedade de outros fatores ambientais, tais como dieta, poluição, alérgenos ambientais, infeções, tabagismo (407, 416). A melhoria das condições higieno-sanitárias das últimas décadas, parece assim ter promovido alterações na maturação do sistema imunitário das crianças, o que representará exatamente um fator de risco para o desenvolvimento de asma e alergia, mas também de autoimunidade (417).

Desde logo a idade é um elemento a considerar. Crianças com sibilância persistente e de manifestação tardia têm um maior risco de asma do que crianças com sibilância intermitente até aos 3 anos de idade (418). Parece existir também, ao nível das doenças atópicas, modulação

decorrente do género, que, porém, afeta o risco de asma de uma forma dependente da idade. Da infância à adolescência, há uma maior prevalência de asma no sexo masculino. Esta situação reverte-se na adolescência, encontrando-se a partir daí uma maior prevalência no sexo feminino (419, 420). Um elemento a considerar neste âmbito, é o menor calibre brônquico observado em crianças do sexo masculino. Acentuando a importância do estrogénio no desenvolvimento pulmonar após o nascimento, e a inibição dos androgénios na produção de surfactantes, o risco aumentado de infeções respiratórias nos bebés do sexo masculino poderá ter também uma base endócrina (421). Por sua vez, a sensibilização atópica, a ocorrência de infeções respiratórias e o uso de antibióticos no período pós-natal, mais frequentes em crianças do sexo masculino, encontram-se entre os fatores de risco para o desenvolvimento de asma (415, 422, 423).

Vários estudos assinalam a história familiar de atopia (materna e paterna) entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de asma e doenças atópicas (415, 424-427). No entanto, a história de atopia materna surge normalmente associada a um maior risco quando comparada com a história paterna (355). A predisposição genética para a asma está contudo pouco caracterizada como fator de risco, apesar de ser claro que os padrões hereditários da transmissão da doença não seguem o normal padrão mendeliano. Duas grandes linhas têm sido apontadas para a associação entre risco de asma e história familiar: a herança de alelos que promovam a diferenciação de respostas Th2 e a própria transmissão de respostas desviadas do normal perfil inflamatório, que condicionam por isso o sistema imunitário das crianças (415, 428). A relação inversa entre o tamanho da família e a ocorrência de asma na infância é um fator de risco em países mais desenvolvidos, onde se encontra intimamente ligado aos processos atópicos (429).

Em relação à etnia e ao seu impacto nas doenças atópicas, nos esparsos dados disponíveis, documentam-se variações étnicas (430-432), com estudos em migrantes, que saem de países em desenvolvimento para países industrializados, a apontar para um maior risco de asma e alergias nestas populações em relação aos seus países de origem (433, 434). Parece assim que apesar das variações étnicas, o estilo de vida, os fatores socioeconómicos e ambientais parecem ter igualmente impacto no desenvolvimento das doenças atópicas, ainda que não possam descurar-se os fatores genéticos (435).

Considerando os acontecimentos perinatais, o parto pré-termo, o baixo peso à nascença e um grande ganho de peso ao longo do tempo na primeira infância, são também fatores que parecem conferir à criança um risco acrescido para o desenvolvimento de asma (436). Também os partos por cesariana surgem como fatores de risco a considerar, uma vez que podem condicionar e modificar a clássica exposição à microbiota materna no parto (437, 438). Encontramos ainda na literatura associações entre o mês do parto e o desenvolvimento de doenças atópicas, motivadas por diferentes padrões de exposição a alérgenos no fim da gravidez, e no período pós-parto. Concretamente, o nascimento nos meses de Outono e Inverno associam-se com o desenvolvimento de eczema atópico e asma (439). Como se referiu anteriormente, os efeitos da amamentação no desenvolvimento de asma não são claros, podendo representar ou não risco acrescido para atopia e asma. A exposição ao fumo do tabaco é igualmente um fator de risco para asma. Aqui contemplam-se não só a exposição intrauterina, como também exposições pós-natais, com risco acrescido nas crianças em que a mãe e/ou o pai sejam fumadores (440).

Uma considerável percentagem de crianças com bronquiolite viral e/ou infeções respiratórias graves no primeiro ano de vida vem a desenvolver asma e doenças atópicas durante a infância, adolescência e início da vida adulta (441, 442). Entre os agentes etiológicos, particular relevância tem sido dado ao vírus sincicial respiratório (VSR), o mais frequente, mas também aos rinovírus (443, 444). Infeções pelo VSR parecem associar-se ao subsequente aparecimento de manifestações atópicas e asma. Na coorte sueca que acompanhou crianças hospitalizadas por bronquites a VSR no primeiro ano de vida, foi encontrado um risco aumentado para o desenvolvimento de asma e sensibilização atópica aos 7 anos de idade e aos 18 anos de idade (441, 442). Recentemente, foi também descrita a capacidade de o VSR promover desvios na resposta imune no sentido Th2, através da ativação da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelo vírus (445). A sibilância induzida por infeções a rinovírus tem vindo a ser associada com a sensibilização alérgica (444). Em suma, a hospitalização por infeções respiratórias até aos 3 anos de idade confere um risco elevado do desenvolvimento de asma na infância (446). Estudos experimentais e epidemiológicos apontam também para o papel protetor de infeções por helmintas, através de elementos imunomoduladores característicos destes parasitas (447).

A exposição a vários tipos de alérgenos ambientais e a consequente sensibilização dos indivíduos para estas moléculas têm sido associadas com o desenvolvimento de doenças atópicas. No caso da asma, encontramos a sensibilização a alérgenos inalantes domésticos como o fator de risco mais importante para o seu desenvolvimento (448). Contudo, o contacto com animais domésticos e animais da quinta, e o ambiente rural durante a infância parecem ser elementos protetores em relação à sensibilização atópica (194). Finalmente, encontramos ainda a exposição a poluentes interiores e exteriores como estando associados ao desenvolvimento de doenças atópicas (449, 450). Níveis séricos elevados de IgE total e eosinofilia periférica presentes nos primeiros anos de vida foram considerados ainda fatores de risco para asma brônquica (451, 452).

Fatores como obesidade, sedentarismo, dietas ricas em *fast food* e pouco consumo de frutas e vegetais são também apontados como de risco acrescido para asma e para as suas manifestações, com a dieta mediterrânea a associar-se a uma redução na prevalência de asma (453).

1.4.4 Classificação

A classificação da GINA 2015 refere, para além da asma alérgica, asma não-alérgica, asma de manifestação tardia, asma com limitação fixa do volume de ar e asma associada a obesidade (396). Os mecanismos subjacentes às formas não alérgicas não estão ainda bem definidos, apesar de as alterações inflamatórias serem similares nas diversas formas de asma (190).

A limitação da normal ventilação pulmonar está relacionada com várias alterações que vão decorrer ao nível das vias respiratórias, nomeadamente a eventos de broncoconstrição, edema da mucosa, hiperreatividade brônquica e remodelação das vias aéreas (396). O resultado da inflamação crónica será então a remodelação das vias aéreas, assumindo-se, de facto, os dois fatores juntos (inflamação e remodelação) como estando na génese das manifestações clínicas da asma (454, 455). Desta forma, será também o grau de inflamação, assim como a intensidade dos fenómenos de remodelação que ocorrem nas vias aéreas, que irão determinar a classificação da doença quanto à sua gravidade.

A recente classificação da GINA 2015 baseia-se na manifestação de sintomas associados à doença, dividindo-se os doentes em controlados, parcialmente controlados, ou não controlados. Na avaliação dos doentes são abordados sintomas diurnos mais do que duas vezes por semana, despertar noturno motivado pela doença, necessidade de medicação de alívio mais do que duas vezes por semana, e limitação de atividade motivada pela asma. Assim, um doente controlado não apresenta qualquer destas situações, com os *cutoffs* de 1 a 2 manifestações, e de 3 a 4 manifestações, a serem aplicados respetivamente à asma parcialmente controlada ou não controlada (396).

Em paralelo, e de acordo com a avaliação retrospectiva da terapêutica instituída para controlar sintomas e exacerbações, classifica-se também a asma como ligeira, moderada, ou severa. Considerando que a marcha terapêutica atualmente recomendada prevê 5 etapas, como proposto na figura 10, a asma é considerada ligeira quando pode ser controlada com terapêutica nos degraus 1 e 2; moderada, quando controlada com terapêutica do degrau 3; e grave quando requer os degraus 4 e 5, para ser controlada ou mesmo quando nem estes permitem o seu controlo (396).

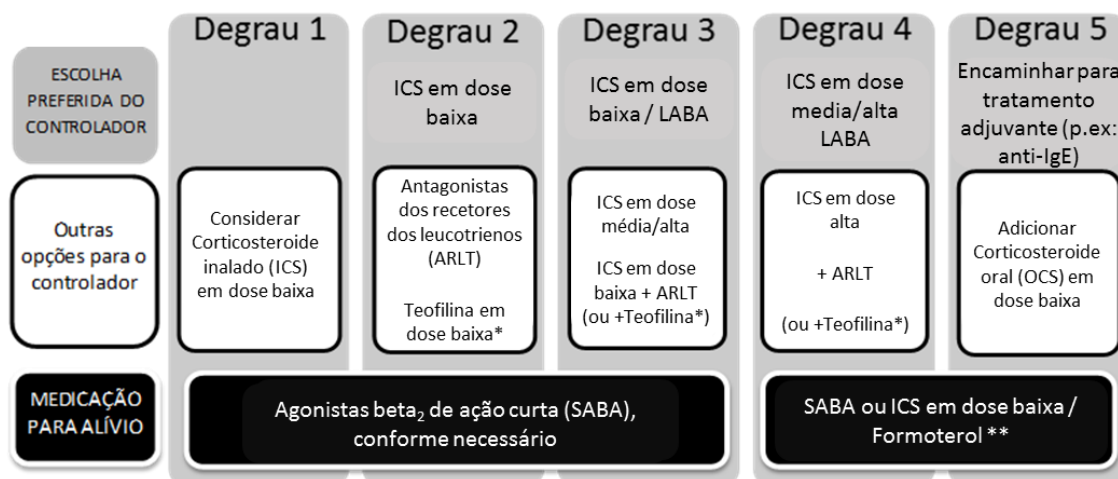


Figura 10 – Abordagem, degrau a degrau, ao tratamento da asma. Adaptado de GINA 2015 (396).

*Para crianças de 6-11 anos, a teofilina não é recomendada, e o tratamento preferido do Degrau 3 é ICS em dose média. **ICS em dose baixa/formoterol é a medicação de alívio para doentes aos quais foi receitada budesonida em dose baixa/formoterol ou beclometasona em dose baixa/formoterol.

SABA – Agonistas beta₂ de ação curta, LABA – Agonistas beta₂ de ação prolongada, ARLT – Antagonistas dos receptores dos leucotrienos, ICS – Corticosteroide inalado, OCS – Corticosteroide oral.

Finalmente, para a avaliação da limitação no volume de ar expirado, provas de função respiratória, com recurso a espirometria ou à avaliação de volumes por pletismografia são os métodos mais aceites pela comunidade científica. Apesar de estas avaliações poderem correlacionar-se com os sintomas ou com outros marcadores da doença (456, 457), parecem contudo importantes para a caracterização e seguimento das doenças respiratórias na criança e no adulto, sobretudo aplicadas à confirmação do diagnóstico, e à avaliação da eficácia da terapêutica, possuindo também valor prognóstico (458-460).

1.4.5 Asma e Rinite Alérgica

Para além das vias inferiores, o sistema respiratório inclui também as vias aéreas nasais e os seios perinasais. Aliás, a mucosa brônquica e a mucosa nasal evidenciam similaridades e

complementaridade funcional. Esta proximidade parece manifestar-se também no facto de a maior parte dos doentes com asma terem rinite como co-morbilidade associada, ainda que possa haver manifestações de rinite sem asma e vice-versa. O impacto da rinite alérgica no curso da asma inclui o aumento do risco de exacerbações e ataques de asma, bem como o aumento de episódios de urgência e hospitalização para doentes asmáticos (399).

Reconhecendo a importante relação entre asma e rinite alérgica, promovida pela OMS, nasceu a iniciativa ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), uma organização não-governamental, com o objetivo de educar e implementar uma gestão baseada em evidências de rinite alérgica em conjugação com a asma, à escala mundial.

Apesar de a asma e outras doenças alérgicas terem já sido descritas na Antiguidade, a rinite alérgica, também conhecida como febre dos fenos, é uma condição relativamente moderna. Encontram-se apenas algumas descrições em textos Islâmicos do século IX, e mais tarde, também na Europa do século XVI. No início do século XIX foi descrita esta doença rara à data, tendo a sua causa sido associada mais tarde aos pólenes. A doença, contudo, espalhou-se com o fenómeno da industrialização. A Europa e a América do Norte assumiam já esta doença como comum, ainda que de prevalência baixa, no fim do século XIX, e a sua prevalência tem vindo num crescendo até aos nossos dias (399).

A rinite alérgica é uma patologia de cariz inflamatório, que afeta as mucosas nasais. Os efeitos da resposta de hipersensibilidade nesta zona, normalmente IgE-mediada, incluem prurido, esternutação, rinorreia e obstrução nasal (190). A rinoconjuntivite alérgica, com a zona ocular a apresentar-se lacrimante, com prurido e vermelhidão, apresenta-se também frequentemente associada à rinite alérgica, sugerindo-se inclusive a sua designação como rinoconjuntivite alérgica (190, 461). Para além da rinite alérgica, encontram-se descritas entidades, como a rinite infecciosa, a rinite ocupacional, a rinite induzida por drogas, a rinite hormonal, entre outras (399). De entre as formas não infecciosas, a rinite alérgica é a mais comum, com sintomatologia a manifestar-se normalmente em dois ou mais dias consecutivos, e por mais de uma hora na maioria dos dias (462).

Ainda segundo o ARIA, a rinite é classificada como intermitente ou persistente, de acordo com a duração dos sintomas. As designações de ligeira e moderada a grave aplicam-se aos efeitos dos sintomas nas atividades do doente (399). Assim, rinite alérgica intermitente manifesta-se menos de 4 dias por semana ou menos de 4 semanas por ano; enquanto a rinite persistente tem no mínimo manifestações em 4 dias por semana e 4 semanas por ano. A rinite ligeira apresenta sintomas mínimos, com impacto reduzido no sono e nas atividades quotidianas, opondo-se a isto a rinite moderada a grave, com sintomas incapacitantes, acompanhados de desconforto durante as atividades quotidianas, profissionais ou escolares, assim como alterações do sono.

A prevalência da rinite alérgica tem vindo a aumentar em todo o mundo, em particular nas áreas onde tinha menor prevalência. Como observado noutras doenças alérgicas, as áreas de maior prevalência estarão a atingir uma fase de plateau, ou mesmo a entrar numa fase descendente (399, 463). Assumindo os dados reportados pela fase III do ISAAC, descrevem-se para a rinoconjuntivite valores a nível mundial entre os 0.8% e 14.9% para crianças entre os 6 e os 7 anos, e valores entre 1.4% e 39.7% nos adolescentes entre os 13 e os 14. Para Portugal, os valores aproximaram-se de 9.3% e 9.5%, para os grupos entre os 6 e os 7 anos, e entre os 13 e

os 14 anos, respetivamente (416, 464). Em relação à idade adulta, estudos na população europeia reportaram a presença de rinite autodiagnosticada em 19% da população, reduzindo-se a percentagem para 13%, no que se refere a rinite com diagnóstico clínico (465). Um outro estudo na população europeia suporta uma percentagem elevada de doentes com rinite moderada a severa (67.2%); observando-se ainda rinite persistente em 42.5% dos doentes. Em cerca de um terço dos doentes com rinite alérgica foi observada ainda a presença de asma (466).

Em Portugal, o estudo epidemiológico transversal ARPA (Avaliação da Prevalência e Caracterização da Rinite em Portugal Continental), que contou com 6859 participantes, dos quais 62.8% era mulheres, observou uma prevalência média de rinite alérgica confirmada por clínico nos 9.4% dos casos. No total, a prevalência de rinite na população portuguesa rondava os 26.1%, com valores mais elevados nas mulheres (467, 468). Dos estudos epidemiológicos pode também comprovar-se a elevada prevalência desta doença crónica, que se manifesta em todas as faixas etárias, desde a infância até ao idoso (469).

Quanto aos fatores de risco, apresenta-se para a rinite alérgica, assim como para a asma atópica, a importância do *background* genético e da história familiar. A hipótese higiénica e a exposição a fatores ambientais podem igualmente influenciar o desenvolvimento de doença. Nomeadamente, a exposição a aeroalergénios, *indoor* ou ambientais, é muitas vezes implicada no desenvolvimento de rinite alérgica (assim como se referiu para a asma). Para a rinoconjuntivite alérgica, o nascimento durante a época de polinização primaveril foi associado a um risco menor de desenvolvimento da doença bem como de presença de IgE específicas para pólen (439). No entanto, a literatura aponta também um maior risco para alergia ao pólen em crianças que tenham exposição nos primeiros seis meses de vida, ou seja, que tenham nascido entre Abril e Maio (470). Ainda a presença de poluentes e o fumo do tabaco parecem relacionar-se com a rinite alérgica, sobretudo pelo aumento que geram nos níveis de IgE (total e específica) e por isso mesmo na sensibilização alérgica (399). Estudos na gravidez reportaram uma associação entre a exposição ao tabaco (mais de 20 cigarros por dia) e o desenvolvimento de atopia. Nas crianças expostas, observou-se um risco aumentado para sintomas de rinite durante o primeiro ano de vida, e rinite alérgica ao 1 ano de idade (471).

Em simultâneo, apesar de algumas diferenças entre as mucosas nasal e brônquica, como a ausência de músculo liso na mucosa nasal, tem vindo a ser defendida a ideia de “uma via respiratória, uma doença”. Atendendo a estas considerações, uma estratégia terapêutica combinada parece ser ideal para o tratamento das doenças das vias respiratórias. Destacam-se os anti-histamínicos na primeira linha do tratamento da rinite alérgica. Os anti-inflamatórios, como os corticoides ou o montelucaste, parecem ter efeitos benéficos ao nível da rinite e da asma alérgica. Na relação entre rinite e asma alérgica há, em suma, a salientar, o risco que a rinite representa para a asma alérgica e para o seu controlo. O tratamento da rinite alérgica parece ser importante para reduzir a gravidade da asma, diminuindo o número de hospitalizações e episódios de urgência (399). Assim, e tendo em conta que asma e rinite frequentemente complicam a gravidez, apresentando riscos para mãe e feto, devem ser implementadas estratégias terapêuticas em mulheres grávidas com asma persistente e rinite, de forma a prevenir ou controlar os riscos associados a ambas as condições (472).

2. Objetivos do Trabalho

Da análise da literatura, parece inegável a importância do período de vida pré-natal para o desenvolvimento do sistema imunitário. Neste âmbito, a transmissão de atopia à descendência em mulheres atópicas, e concretamente com asma alérgica, poderá ser moldada desde este período. A possibilidade de identificar marcadores de risco precoces para o desenvolvimento de atopia poderá ser o primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de prevenção para os indivíduos em risco. Desta forma, este trabalho pretendeu abordar o sistema imunitário materno de forma a enriquecer a sua caracterização desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério. Para além da exploração de perfis celulares e citocínicos maternos (nos quais se incluiu sobretudo a avaliação de diferentes populações de células T e B, com funções efetoras e reguladoras), foi também considerada a sua eventual relação com o desenvolvimento de atopia nas crianças. Podemos assim assinalar como principais objetivos do trabalho:

- Estudar o impacto da gravidez em mulheres com asma alérgica, pela avaliação de perfis celulares e citocínicos observados no terceiro trimestre da gravidez.
- Avaliar a evolução dos parâmetros imunes abordados na gravidez até ao fim do puerpério, de forma a inferir se os efeitos da gravidez são mantidos no período pós-natal em mulheres com asma alérgica.
- Explorar a relação entre os parâmetros imunes maternos estudados e a subsequente existência de intercorrências alérgicas nos primeiros seis meses de vida da descendência de mulheres com asma alérgica.
- Identificar, entre os parâmetros imunes maternos, possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres com asma alérgica.

3. Material e Métodos

3.1 Organização do Estudo

3.1.1 População do estudo e seu recrutamento

Entre Julho de 2013 e Dezembro de 2014 foram recrutadas de forma sequencial e consecutiva mulheres grávidas atópicas seguidas nas consultas de Ginecologia/Obstetrícia e de Alergia na Gravidez do Centro de Alergia do Hospital CUF Descobertas. Para além do grupo alvo do estudo, i.e., grávidas atópicas (GA), foram igualmente recrutadas mulheres para outros três grupos, nomeadamente, mulheres não grávidas atópicas (NGA), e mulheres saudáveis, não atópicas, grávidas (GS) e não grávidas (NGS).

A todas as mulheres foi entregue um documento com informações genéricas sobre o projeto, nomeadamente os seus objetivos e o desenho do estudo, que foi acompanhado por um formulário de consentimento informado. Antes de serem incluídas no estudo, todas as mulheres assinaram o respetivo consentimento informado, de forma livre e voluntária, confirmando a sua aceitação em participar. Todas as participantes foram igualmente informadas de que poderiam abandonar o estudo em qualquer altura, sem qualquer prejuízo para o seu seguimento clínico, ou para o eventual acompanhamento do nascituro. A cada participante no estudo foi atribuído um código interno do projeto, com o qual as amostras foram identificadas e posteriormente tratadas, de forma a proteger a privacidade de cada participante e maximizar a confidencialidade dos dados e resultados obtidos. A Comissão de Ética do Hospital CUF Descobertas e a Comissão de Ética da NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL) aprovaram o protocolo do estudo, e todas as investigações foram realizadas seguindo as linhas de orientação da Declaração de Helsínquia (397).

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Todas as mulheres a recrutar teriam de se encontrar obrigatoriamente em idade reprodutiva (entre os 20 e os 45 anos de idade), sendo obviamente a gravidez o requisito inicial para inclusão num dos grupos de mulheres GS ou GA, e a ausência de gravidez o requisito para os grupos de mulheres NGS e NGA.

Os grupos GA e GNA incluíram mulheres com asma alérgica e rinite alérgica, clinicamente diagnosticadas. Em ambos os grupos, o diagnóstico de asma alérgica, rinite alérgica e outras manifestações atópicas (eczema/dermatite atópica), foi avaliado pelo médico Imunolergologista que acompanhou estas mulheres ao longo do estudo, de acordo com as *guidelines* atuais (189, 473, 474). A atopia foi avaliada por testes cutâneos positivos e/ou por doseamento de IgE específicas para alérgenos ambientais inalantes (pelo menos com valores iguais ou superiores a 0,35 KU/L).

Todas as asmáticas foram avaliadas igualmente de acordo com o definido nas *guidelines* do programa *Global Initiative for Asthma* (GINA), incluindo a ocorrência de sintomas diurnos, despertares noturnos devidos à asma, necessidade de medicação para alívio de sintomas e limitação de atividade em decurso da asma (396). Estes dados foram devidamente registados para efeitos de análise subsequente. Para a sua inclusão no estudo, todas as mulheres GA e NGA teriam de se encontrar sem agudização de asma ou rinite nas seis semanas anteriores à colheita

de amostras na avaliação inicial. Assim, as mulheres incluídas deveriam ter asma ligeira a moderada e rinite persistente, encontrando-se sob terapêutica com ICS associados a LABA e/ou montelukaste. Nas 48 horas anteriores à colheita, deveria suspender-se a terapêutica com LABA.

Definiram-se como critérios de exclusão para todos os grupos:

- Diabetes mellitus;
- hipertensão arterial;
- doenças autoimunes;
- doenças inflamatórias do intestino;
- qualquer doença infecciosa, incluindo hepatites virais e infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH);
- consumo de tabaco nos seis meses que antecederam o recrutamento;
- história anterior de neoplasia;
- outras doenças respiratórias.

No que se refere às gestantes (GA ou GS), foram excluídas mulheres com gravidezes múltiplas e/ou com complicações obstétricas no decurso da gravidez. O uso pré-natal de qualquer medicação foi igualmente um critério de exclusão, sendo apenas admitida a utilização de suplementos de ferro, ácido fólico e vitaminas nas mulheres dos grupos GS e GA. Nas mulheres NGS, o uso de quaisquer terapêuticas continuadas foi tido como um critério de exclusão.

3.1.3 Desenho do estudo

O estudo foi desenhado contemplando recolhas de sangue às mulheres grávidas, em três avaliações temporalmente bem definidas: durante o terceiro trimestre de gravidez (entre a 31.^a e a 36.^a semanas de gestação) – T1; no dia do parto, cerca de 15 a 30 minutos após a dequitação da placenta – T2; após o período do puerpério (pelo menos 6 semanas após o parto) – T3. Em cada avaliação foram também recolhidos dados demográficos e informação clínica complementar. Posteriormente, foram avaliadas as crianças nadas-vivas, após os primeiros seis meses de idade, igualmente com recolha de informação demográfica considerada relevante, e em particular, informação clínica referente a manifestações atópicas neste período pós-natal. Nas mulheres não grávidas, apenas uma avaliação foi considerada, na qual se recolheu igualmente sangue, bem como informação clínica e dados demográficos. O esquema do estudo apresenta-se na figura 10.

Resumidamente, os questionários aplicados às mulheres recrutadas abrangiam os seguintes pontos:

- Antecedentes Pessoais: contemplando o registo de dados antropométricos e demográficos, exposição ao fumo do tabaco, e ainda a existência de doenças alérgicas (e/ou outras) e suas manifestações. Acrescentaram-se, nas mulheres grávidas, dados referentes à gestação (duração, tipo de parto, complicações durante a gravidez, e/ou perinatais, terapêuticas em curso) e ao período pós-natal (amamentação, contraceção e eventuais complicações no puerpério).
- Antecedentes Familiares: onde se considerou apenas a existência de doenças alérgicas, nomeadamente atópicas, nos familiares de primeira linha (pais e irmãos das mulheres recrutadas).



Figura 11 – Esquema da calendarização do processo de recrutamento para cada grupo de mulheres do estudo.

GA – mulheres grávidas atópicas, GS – mulheres grávidas saudáveis, NGA – mulheres não grávidas atópicas, NGS – mulheres não grávidas saudáveis, T1 – avaliação temporal 1 (3.º trimestre de gravidez), T2 – avaliação temporal 2 (parto), T3 – avaliação temporal 3 (6 semanas após o parto).

Em relação às crianças, os questionários utilizados pretenderam a recolha de informação acerca do período pós-natal (uma vez que os dados referentes à gestação foram sendo recolhidos ao longo do estudo). Assim, para além dos dados antropométricos no nascimento, foram consideradas complicações perinatais, necessidade de internamento em Unidade de Cuidados Intensivos, número de irmãos e frequência de infantário. No que diz respeito às manifestações de risco para atopia, ao longo dos primeiros seis meses de vida foi considerada a ocorrência de eczema, sibilância, alergia alimentar, bem como a terapêutica preventiva entretanto instituída (475, 476). A ocorrência de eczema e sibilância foram avaliadas de acordo com os critérios dos questionários do estudo ISAAC (477), registando-se igualmente a idade da primeira manifestação. O eczema foi definido pela presença de *rash* com prurido, em localizações que não a zona da fralda, a zona periocular, e/ou o maciço central. A sibilância recorrente foi considerada sempre que se manifestaram três ou mais episódios de sibilância nos primeiros seis meses de vida (478), no entanto foram registados todos os episódios de sibilância.

No que se refere às colheitas de sangue periférico, estas foram efetuadas por punção venosa do sangradouro, no Hospital CUF Descobertas. A cada mulher, em cada avaliação, três tipos de tubos de colheita foram utilizados para recolher as amostras de sangue: tubos com o anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetracético (EDTA), cujo sangue foi usado para os estudos imunofenotípicos (aproximadamente 3mL de sangue por colheita); tubos com o anticoagulante Heparina de Lítio, cujo sangue foi utilizado nas avaliações funcionais (aproximadamente 8mL de

sangue por colheita); e tubos sem anticoagulante, a partir dos quais se separou o soro, após retração do coágulo e posterior centrifugação (aproximadamente 5mL de sangue por colheita). Após a colheita, todos os tubos foram transportados para o Laboratório de Imunologia da NOVA Medical School|FCM-UNL. As amostras de sangue colhidas para tubos com anticoagulante (EDTA e Heparina) foram conservadas à temperatura ambiente, e processadas num prazo máximo de 24-48 horas após a colheita. Os tubos sem anticoagulante, refrigerados durante o transporte até ao laboratório, foram centrifugados em centrífuga *Haereus*®, durante 10 minutos a 2500 rpm (aproximadamente 1200 x g). Após a centrifugação, as amostras de soro foram separadas em alíquotas, e congeladas a -80°C, até serem utilizadas nos doseamentos dos mediadores imunes avaliados.

3.1.4 Parâmetros imunológicos a avaliar

Considerando os objetivos deste trabalho, que se prendem com a caracterização imunológica de grávidas com asma atópica e com a identificação de fatores preditivos para o desenvolvimento de atopia na sua descendência, foi estabelecida a avaliação de diferentes parâmetros celulares e de alguns mediadores importantes nas respostas alérgicas. Desde logo, a crescente relevância dada às populações celulares com funções reguladoras, e à sua desregulação no contexto da asma e das doenças atópicas, levou-nos a considerar a sua abordagem por citometria de fluxo. Dentro dos Treg, a heterogeneidade das caracterizações descritas na literatura, que eventualmente terão condicionado algumas das discrepâncias nos resultados avaliados (359), levou-nos à consideração de três estratégias de análise, a partir das quais se classificaram distintas populações celulares Treg: as clássicas células CD4⁺CD25^{Hi}FoxP3⁺ (479, 480), as células CD4⁺CD25^{Hi}CD127^{Dim} avaliadas de acordo com a expressão do recetor da IL7 (55, 56) e as células CD4^{Dim}CD25^{Hi}, que demonstraram recentemente apresentar um fenótipo Treg mais pronunciado (481). Como se reportaram também alterações funcionais relacionadas com a expressão de Foxp3 nas células Treg, quer na gravidez (481), quer no contexto atópico (482, 483), foi ainda avaliada a expressão deste fator de transcrição, por citometria de fluxo. Na ausência de um marcador específico, à data, é ainda controversa a caracterização das células Breg. Atualmente, no humano, as populações B mais aceites com funções de regulação são células B de transição CD24^{Hi}CD38^{Hi} e células B10 CD24^{Hi}CD27⁺ (141, 145), que por isso se abordaram neste estudo. Em ambas, surge como elemento crucial a produção de IL10, que foi igualmente avaliada após estimulação com lipopolissacárido bacteriano (LPS), acetato de forbolmiristato (PMA) e ionomicina, de acordo com o descrito na literatura (143, 484). Com este protocolo foi ainda avaliada a produção de IL10 nos linfócitos T.

Reconhecendo na capacidade de produção de IFN-γ um elemento potencialmente relacionado com o risco de atopia (358), e tendo em conta a crescente importância de outros perfis celulares para além do Th2 na génese da asma alérgica (102, 485), a abordagem funcional foi exatamente completada com a avaliação dos perfis efetores Th/Tc1 e Th/Tc17 (486). Deste modo, foi avaliada a capacidade de produção de IFN-γ e IL17 pelos linfócitos T (CD4 e CD8) após estimulação com PMA e ionomicina, frequentemente usada na literatura, conforme se comenta por Karlsson e colaboradores (486). Para não descurar a avaliação comparativa dos perfis Th1/Th2 nas mulheres estudadas, considerando as limitações técnicas descritas para a avaliação das células produtoras de IL4 ou IL5 por citometria de fluxo, após estimulação celular (335, 487), optou-se por proceder à avaliação dos níveis séricos das citocinas IFN-γ e IL4, que se assumiram assim como marcadores sistémicos dos respetivos perfis Th1 e Th2.

A completar o estudo celular, foram adicionalmente caracterizados os perfis de maturação e ativação das células T e B circulantes. No caso das células T, vários marcadores têm sido utilizados em simultâneo de forma a estabelecer os diferentes períodos maturativos desde a célula T naïve às diferentes subpopulações de células de memória: CD45RA, CD45RO, CD62L, CCR7 (CD197) ou CD27 (488, 489). Para este trabalho, e seguindo o protocolo validado na rotina do Laboratório de Imunologia da NOVA Medical School|FCM-UNL, considerou-se a combinação de CD45RA e CD62L, frequentemente reportada na literatura (490-492). Acrescentou-se ainda a avaliação da expressão de HLA-DR, CD25 e CTLA-4 para estimar os níveis de ativação das células T circulantes (341, 493, 494). As células B, menos abordadas em termos maturativos no âmbito da asma e das doenças atópicas, foram caracterizadas recorrendo à classificação das populações de células naïve e memória com base na expressão de IgD e CD27, completada com os marcadores IgM e CD38 para a caracterização de células de transição e plasmablastos (495, 496). No contexto das doenças autoimunes, onde também se encontram alterações na resposta imune humoral, vários autores têm reportado variações importantes no compartimento B caracterizado segundo a classificação Bm1-5, baseada na expressão de IgD e CD38 (116, 333, 497, 498), que por isso se aplicou igualmente neste estudo.

Para a obtenção de valores absolutos nas populações celulares estudadas, em todas as amostras foi efetuado um ensaio em tubos com esferas de contagem calibradas, que permitiu também a caracterização genérica das subpopulações leucocitárias e linfocitárias em cada amostra.

3.2 Equipamentos Laboratoriais

3.2.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada em grande parte dos ensaios efetuados neste estudo. O citómetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), equipado com um laser azul de emissão nos 488 nm, e com um laser díodo vermelho, com emissão nos 647 nm, possibilitou uma análise multiparamétrica, a 4 cores.

De forma a assegurar a estabilidade das avaliações ao longo do tempo, considerando não só os diferentes tempos avaliados em cada mulher GA e GS, mas também a extensão temporal do estudo, foram desenvolvidos protocolos de preparação (*setup*), calibração e controlo de qualidade do equipamento de acordo com recomendações publicadas em literatura de referência nesta área (499, 500). Foram utilizadas as esferas comerciais BD Calibrite™ Beads (BD Biosciences) com o *software* BD FACS Comp (BD Biosciences), como forma de monitorizar a consistência das intensidades de fluorescência ao longo do tempo. Este protocolo implicou o ajuste automático das voltagens dos fotomultiplicadores do citómetro até que as esferas não marcadas apresentassem as médias de canal para cada fluorescência dentro dos valores alvo do respetivo lote. A este passo, onde se processou também a calibração do *time delay* (o intervalo de tempo que uma partícula demora a passar entre o laser azul e o laser vermelho), seguiram-se processos de compensação automática de fluorescências, uma vez mais limitados por valores alvo previstos para cada grupo de esferas. Sendo este equipamento um citómetro de 4 cores, para além das esferas não marcadas, i.e. não conjugadas com nenhum fluorocromo, foram incluídos mais quatro tipos de esferas, um para cada fluorescência. Assim, para a fluorescência

(FL) 1, usaram-se esferas conjugadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC), para a FL2, usaram-se esferas conjugadas com ficoeritrina (PE), para a FL3, usaram-se esferas conjugadas com Proteínas do complexo Peridina-Clorofila (PerCP) e para a FL4, usaram-se esferas conjugadas com alofocianina (APC). A intensidade de fluorescência das diferentes esferas, avaliada em unidades arbitrárias MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) foi monitorizada em cartas de Levey-Jennings, considerando-se aceitáveis variações até 15% em relação ao valor alvo de MFI.

Para a imunofenotipagem celular foram utilizados distintos painéis de anticorpos monoclonais, previamente validados com base em literatura de referência, ou já com aplicação na rotina do Laboratório de Imunologia da NOVA Medical School|FCM-UNL, onde se realizaram todos os ensaios de citometria de fluxo deste estudo. O processo de verificação inicial dos protocolos implicou a realização de compensações com células, adequadas a cada diferente combinação de fluorocromos. Foram também analisadas amostras preliminares para otimização das folhas de aquisição e análise utilizadas posteriormente nas amostras do estudo. As configurações de compensação adequadas a cada painel foram aplicadas na aquisição das amostras (500). Também nesta fase se procedeu à titulação dos anticorpos monoclonais usados, de forma a otimizar a sua utilização, sem perda dos níveis de fluorescência necessários para a adequada análise dos dados. Os *softwares Multiset™* e *CellQuestPro™*, ambos da *BD Biosciences* foram utilizados para aquisição das amostras e análise dos resultados, guardados sob a forma de *list mode files* (formato FCS 2.0). A utilização de novos lotes de reagentes foi validada previamente, ensaiando-se amostras em paralelo com o reagente a uso e com o novo reagente a introduzir, antes da sua utilização. Foram considerados como aceites os reagentes para os quais os resultados apresentaram coeficientes de variação (CV) inferiores a 10% (na comparação de resultados obtidos com o novo reagente e com o reagente a uso aquando da sua introdução).

3.2.2 Ensaios Imunoenzimáticos

Neste trabalho, foram usados ensaios imunoenzimáticos para o doseamento de citocinas séricas, nomeadamente ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Os equipamentos utilizados incluem um lavador de microplacas automático, STAT Fax 2600 (*Awareness Technology, Inc.*, Palm City, Florida, EUA), com 8 canais, e um leitor de microplacas, STAT Fax 2100 (*Awareness Technology, Inc.*), com vários filtros para leitura de absorvâncias, nomeadamente filtros para leituras a 450nm e 630nm, que foram os selecionados para as determinações séricas deste trabalho. Foram usados dois *kits* comerciais da *Biolegend* (San Diego, CA, EUA), um para doseamento de IL4 (*LEGEND MAX™ Human IL-4 ELISA kit*, referência 430308) e outro para doseamento de IFN- γ (*LEGEND MAX™ Human IFN- γ ELISA kit*, referência 430108). Em cada placa ensaiada foram incluídas sete amostras de calibração e uma amostra correspondendo ao branco do ensaio, cujos valores foram utilizados para obtenção da respetiva curva de calibração. Para além destas amostras, e como forma de atestar a reprodutibilidade dos doseamentos nas diferentes placas processadas, foram também ensaiadas, em cada placa, amostras comerciais de controlo interno (de concentração conhecida) e/ou amostras previamente avaliadas nas placas anteriores, de forma a avaliar o impacto das variações inter-ensaio na comparação dos grupos.

3.3 Protocolos Laboratoriais

3.3.1 Subpopulações Leucocitárias e Linfocitárias

Para a caracterização das subpopulações de leucócitos e linfócitos foi utilizado o *kit* comercial *BD Multitest™ IMK Kit* com *Trucount™ Absolute Counting Tubes* (*BD Biosciences*, referências 340503 e 340334). O *kit* inclui dois cocktails de anticorpos monoclonais, um com a conjugação de CD3, CD4, CD8 e CD45, e o outro com CD3, CD16, CD56, CD19 e CD45. Através de uma estratégia de plataforma única, este *kit* permite a obtenção de contagens absolutas das populações estudadas, encontrando-se validada a sua aplicação em diagnóstico *in vitro* (IVD) na avaliação de linfócitos T, B e células NK. Neste trabalho, este *kit* foi também usado na caracterização e quantificação de Leucócitos totais, e das populações de Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Basófilos e Eosinófilos. A abordagem laboratorial do *kit* foi efetuada de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a partir das amostras colhidas em tubo com EDTA, pipetaram-se 50 µL de sangue total, com pipetagem reversa, para tubos *Trucount*, onde se acrescentaram os *cocktails* de anticorpos monoclonais respetivos (10 µL de CD3/CD8/CD45/CD4 num tubo, 10 µL de CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 para outro tubo, de acordo com o Pannel 1 da tabela 4). A incubação dos anticorpos decorreu à temperatura ambiente, no escuro, durante 15 minutos. Um protocolo de lise-sem lavagem foi seguido, acrescentando-se então a cada tudo 450 µL de uma diluição a 1:10 de *BD FACS™ Lysing Solution* (*BD Biosciences*, referência 349202), para a destruição de eritrócitos. Seguiu-se uma segunda incubação, nas mesmas condições da incubação anterior, após a qual as amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo com o programa *Worklist manager*, associado ao *software Multiset*. De acordo com as recomendações do fabricante, foram adquiridos em cada tubo pelo menos 2500 linfócitos, identificados na região CD45^{Hi} SSC^{Low} de um diagrama biparamétrico de CD45 vs SSC.

3.3.2 Caracterização do compartimento T circulante

Os linfócitos T foram estudados com vários painéis de anticorpos monoclonais, usados para caracterizar sobretudo o seu perfil maturativo, a expressão de marcadores de ativação e ainda subpopulações de células T reguladoras. Os painéis estão descritos na tabela 4, tendo sido usado um protocolo simples de lise e lavagem para todos, com exceção do painel para avaliação da expressão de Foxp3, que se descreve separadamente. Em suma, para a generalidade dos painéis, os anticorpos monoclonais foram incubados com 100 µL de sangue periférico (colhido em tubo com EDTA), durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Seguiu-se um passo de lise com 2 mL da solução *BD FACS™ Lysing* (diluída a 1:10) nas mesmas condições da incubação anterior. Após um passo de lavagem, as células, fixadas com 200 µL de *BD CellFIX™* (*BD Biosciences*, referência 340181), solução diluída a 1:10 com água destilada, foram adquiridas no citómetro.

Nos protocolos de imunofenotipagem considerados neste trabalho, sempre que se referem etapas de lavagem das células, estas implicaram a adição de 2 mL de *BD FACsFlow™ Sheath Fluid* (*BD Biosciences*, referência 342003) a cada tubo, seguida por uma centrifugação das células durante 5 minutos a 1200 rpm (aproximadamente 275 x g), com posterior decantação do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* celular.

Ao nível da avaliação da expressão do fator de transcrição Foxp3 por citometria de fluxo, o painel 4 da tabela 4 apresentou um protocolo diferente do acima descrito. Assim, o *kit BD Pharmingen™ Human FoxP3 Buffer Set* (BD Biosciences, referência 560098) foi utilizado de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, para células lisadas. Resumidamente, a um passo de lise inicial, com 2,5 mL de *BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer* (BD Biosciences, referência 555899) diluída a 1:10 com água destilada, seguiu-se uma lavagem com *BD FACSFlow™*.

Procedeu-se entretanto à incubação das células lisadas (100µL por tubo) com os anticorpos monoclonais de superfície (CD4 e CD25, conforme descrito na tabela 4), durante 20 minutos no escuro. De seguida, as células foram novamente lavadas, e fixadas durante 10 minutos no escuro, com 2 mL da solução A do *kit*, previamente diluída a 1:10 com água destilada. A partir desta etapa, todas as lavagens foram efetuadas com um tampão de marcação distinto: *BD Pharmingen™ Stain Buffer* (FBS) (BD Biosciences, referência 554656). Assim, a um novo passo de lavagem, já com o novo tampão, sucedeu-se a permeabilização das células com a solução C do *kit* (0,5 mL por tubo). A solução C tinha sido preparada a partir das soluções A e B do mesmo *kit*, a uma razão de 1:50 (Buffer B:Buffer A). Esta incubação demorou 30 minutos, no escuro, e só depois de nova lavagem se incubaram as células com o anticorpo monoclonal anti-Foxp3, novamente durante 30 minutos, no escuro. Todas as incubações decorreram à temperatura ambiente.

Para todos os protocolos acima descritos foram criadas folhas de aquisição e análise com o *software BD CellQuestPro™*, definindo-se um mínimo de 10 000 linfócitos T CD4⁺ ou linfócitos T CD8⁺ a adquirir em cada tubo ensaiado, de acordo com a população em estudo, para o painel 2. Na aquisição dos tubos dos painéis 3 e 4, o valor mínimo de linfócitos T CD4⁺ adquiridos passou para 15 000. As diferentes estratégias de análise utilizadas em cada painel acham-se exemplificadas nas figuras do 12 a 16 do capítulo 3.4 – Análise de Resultados.

Tabela 4 - Painéis de Anticorpos Monoclonais utilizados na caracterização imunofenotípica das amostras estudadas.

Painel 1 Subpopulações Linfocitárias e Leucocitárias	FL1	FL2	FL3	FL4	Clones
Tubo 1	CD3 FITC	CD8 PE	CD45 PerCP	CD4 APC	CD3 FITC (clone SK7), CD4 APC (clone SK3), CD8 PE (clone SK1), CD16 PE (clone B73.1), CD19 APC (clone SJ25C1), CD45 PerCP (clone 2D1 (HLA-1)) e CD56 PE (clone NCAM16.2).
Tubo 2	CD3 FITC	CD16+CD56 PE	CD45 PerCP	CD19 APC	Todos incluídos no kit BD IMK (Ref.340503, BD Biosciences).
Painel 2 Perfil Maturativo e de Ativação dos Linfócitos T	FL1	FL2	FL3	FL4	Clones
Tubo 1	CD45RA FITC	CD62L PE	CD3 PerCP	CD4 APC	CD3 (clone UCHT1, Ref. 300428, Biolegend)
Tubo 2	CD45RA FITC	CD62L PE	CD3 PerCP	CD8 APC	CD4 (clone SK3, Ref. 344614, Biolegend)
Tubo 3	HLA DR FITC	CTLA-4 PE	CD3 PerCP	CD4 APC	CD8 (clone SK1, Ref. 344722, Biolegend)
Tubo 4	HLA DR FITC	-	CD3 PerCP	CD4 APC	CD45 RA (clone HI100, Ref. 304106, Biolegend)
Painel 3 Células Treg	FL1	FL2	FL3	FL4	Clones
Tubo 1	CD3 FITC	CD25 PE	CD4 PerPC Cy5.5	CD127 Alexa647	CD3 (clone SK7, referência 345764, BD Biosciences)
Tubo 2	CD3 FITC	-	CD4 PerPC Cy5.5	CD127 Alexa647	CD4 (clone SK3, Ref. 344608, Biolegend)
Tubo 3	CD3 FITC	CD25 PE	CD4 PerPC Cy5.5	-	CD25 (clone BC96, Ref. 302606, Biolegend)
Painel 4 Expressão de Foxp3 em células Treg	FL1	FL2	FL3	FL4	Clones
Tubo 1	Foxp3 Alexa488	CD25 PE	CD4 PerPC Cy5.5	-	Anti-Foxp3 (clone 259D/C7, Ref. 560047, BD Pharmingen)
Tubo 2	-	CD25 PE	CD4 PerPC Cy5.5	-	CD4 (clone SK3, Ref. 344608, Biolegend)
Tubo 3	Foxp3 Alexa488	-	CD4 PerPC Cy5.5	-	CD25 (clone BC96, Ref. 302606, Biolegend)
Painel 5 Imunofenotipagem de Linfócitos B	FL1	FL2	FL3	FL4	Clones
Tubo 1	CD27 FITC	IgD PE	CD19 PerPC Cy5.5	CD38 APC	CD19 (clone HIB19, Ref. 302230, Biolegend)
Tubo 2	CD27 FITC	CD24 PE	CD19 PerPC Cy5.5	CD38 APC	CD24 (clone ML5, Ref. 311106, Biolegend)
Tubo 3	IgM FITC	-	CD19 PerPC Cy5.5	CD38 APC	CD27 (clone O323, Ref. 302806, Biolegend)
					CD38 (clone HIT2, Ref. 303510, Biolegend)
					Anti-IgD (clone IA6-2, Ref. 555779, BD Pharmingen)
					Anti-IgM (clone G20-127, Ref. 555782, BD Pharmingen)

APC – Alofocianina, Cy – Cianina, FITC – Isotiocianato de Fluoresceína, FL – Fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP – Proteína Clorofila Peridina, Treg – Células T reguladoras.

3.3.3 Caracterização do compartimento B circulante

Para a caracterização das subpopulações de linfócitos B avaliadas neste estudo foi utilizado um único painel de anticorpos monoclonais, descrito na tabela 4. Tal como é possível identificar na análise desta tabela, fazem parte deste painel anticorpos monoclonais contra Imunoglobulinas de superfície das células B, nomeadamente IgD e IgM. Assim, e de forma a reduzir os níveis de autofluorescência e de fluorescência inespecífica normalmente observados nestes protocolos de marcação, introduziu-se uma modificação na técnica, com uma lavagem prévia das células. Neste passo inicial, 500 µL de sangue periférico anticoagulado com EDTA, foram lavados por duas vezes com 2 mL de *BD FACSTFlow™*. A suspensão celular usada nas fenotipagens subsequentes foi obtida após centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos, decantação do sobrenadante e ressuspensão das células em cerca de 300 µL de *BD FACSTFlow™*. De seguida, a um volume de 100 µL da suspensão de células lavadas foram adicionadas as respetivas combinações de anticorpos monoclonais previstas para cada tubo do painel, procedendo-se aos passos de incubação, lise e lavagem tal como descrito para os painéis de caracterização dos linfócitos T.

Uma vez mais o *software BD CellQuestPro™* foi usado para efeitos de aquisição e análise, definindo-se que pelo menos 2 000 linfócitos B CD19⁺ fossem adquiridos em cada tubo ensaiado. As estratégias de análise utilizadas para a identificação das subpopulações de células B estudadas encontram-se sistematizadas nas figuras 17 a 19 do capítulo 3.4 – Análise de Resultados.

3.3.4 Protocolos de Estimulação Celular para a Avaliação da produção de citocinas

As amostras de sangue anticoagulado com heparina foram usadas nos protocolos de estimulação celular para avaliação da produção de citocinas. Considerando os diferentes requisitos para a avaliação das citocinas abordadas no estudo, dois protocolos foram usados.

Assim, numa primeira fase, as amostras de sangue foram diluídas em igual volume de *RPMI 1640 Medium* com solução tampão HEPES (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA, referência R5886), em tubos de Falcon graduados.

Para a avaliação da produção de IFN-γ e de IL17 em linfócitos, as amostras de sangue diluído em RPMI foram estimuladas com 50 ng/mL de PMA (*Sigma-Aldrich*, referência P8139) e 10 µg/mL de ionóforo de cálcio A23187 (*Sigma Aldrich*, referência C7522). Para a avaliação da produção de IL10, aos estímulos usados tal como acima descrito (PMA e ionóforo de cálcio A23187), acrescentou-se também lipopolissacárido de *Salmonella enterica*, serotipo minnesota Re 595 (LPS) (*Sigma Aldrich*, referência L9764) numa concentração de 10 µg/mL. Em ambos os protocolos, a estimulação aconteceu na presença de brefeldina A (*BD Biosciences*, componente do *kit BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™*, referência 555028), usada numa concentração de 1,0 µg/mL. Este inibidor de transporte proteico impediu a secreção das citocinas produzidas pelas células, que assim se mantiveram no seu interior sem serem secretadas para o meio extracelular. A estimulação decorreu durante um período de 5 horas, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, numa estufa *Heraeus HeraCell CO₂ incubator* (*Kendro Laboratory Products*, agora parte da *Thermo Electron Corporation*, Waltham, MA, EUA). Para cada condição de estimulação foram incubadas em paralelo as mesmas amostras, não estimuladas, na presença de igual concentração de brefeldina A.

As amostras não estimuladas funcionaram como controlos de estimulação, avaliando os níveis de produção basal das citocinas avaliadas, e foram também utilizadas como controlo do respetivo protocolo de marcação.

Após o período de incubação, as células foram preparadas para a análise por citometria de fluxo, como se descreve abaixo.

3.3.5 Avaliação da produção de IFN- γ e IL17 por linfócitos T

O protocolo de marcação cumpriu genericamente as recomendações do fabricante para os kits *BD Cytofix/Cytoperm™* (*BD Biosciences*), constantes no respetivo manual. Assim, segundo este documento, o protocolo de estimulação de sangue total contemplava um passo de lise inicial, que foi realizado com a solução *BD Pharm Lyse™* (2 ml por tubo, com incubação no escuro à temperatura ambiente, durante 10 a 15 minutos). Foram processados 4 tubos por amostra, dois com células estimuladas (A1 e A2), e dois com células não estimulados (B1 e B2). Depois de uma lavagem, as células foram incubadas com os anticorpos de marcação de superfície usados neste protocolo: anti-CD3 FITC (clone SK7, referência 345764, *BD Biosciences*) e anti-CD8 PE Cy7 (clone SK1, referência 344712, *Biolegend*), durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após esta incubação procedeu-se à lavagem das células para remoção dos anticorpos não ligados às células, que antecedeu a sua fixação e permeabilização. Assim, a cada tubo foi acrescentado um volume de 0,5 mL de *Fixation/Permeabilization solution* (componente do *BD Cytofix-Cytoperm kit*), que esteve em contacto com as células durante 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Seguiram-se duas lavagens com o tampão de lavagem também fornecido no kit (*BD Perm/Wash buffer*), previamente diluído a 1:10 com água destilada. A última incubação prevista no protocolo foi diferente nos quatro tubos ensaiados. Os tubos A1 e B1 foram marcados com controlos isotípicos (PE Mouse IgG1, referência 400140; e APC Mouse IgG1, referência 400120; ambos da *Biolegend*) e os tubos A2 e B2 com os anticorpos monoclonais anti-IL17 PE (clone BL168, referência 512306, *Biolegend*) e anti-IFN- γ APC (clone B27, referência 506510, *Biolegend*). Uma lavagem final com *BD Perm/Wash buffer*, para remoção do excesso de anticorpo não ligado, antecedeu a aquisição das amostras, ressuspendidas em *BD CellFIX™*.

Com as folhas de aquisição e análise delineadas para esta avaliação no *software BD CellQuestPro™*, foi definido, para efeitos de aquisição, um mínimo de 15 000 linfócitos T CD4⁺ (CD8⁻) a adquirir em cada tubo, com ou sem estimulação. A figura 20 do capítulo 3.4 – Análise de Resultados, exemplifica as estratégias de análise utilizadas para a identificação das subpopulações de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL17.

3.3.6 Avaliação da produção de IL10 por linfócitos T e B

Para a avaliação da produção de IL10 por linfócitos T e B, o mesmo kit *BD Cytofix/Cytoperm* foi utilizado. O protocolo de marcação assemelhou-se ao descrito no parágrafo anterior para as citocinas IFN- γ e IL17, com algumas variações.

Concretamente, foi utilizada uma diferente combinação de anticorpos monoclonais para a marcação de superfície: anti-CD3 FITC (clone SK7, referência 345764, *BD Biosciences*), anti-CD8 APC (clone SK1, referência 344722, *Biolegend*) e anti-CD19 PerCP Cy5.5 (clone HIB19, *Biolegend*). Também após os passos de fixação, permeabilização e lavagem se usaram anticorpos monoclonais distintos, como seria de esperar neste protocolo, com especificidade para a IL10.

Assim, as células fixadas e permeabilizadas foram incubadas durante 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente com o controle isotípico PE nos tubos A1 e B1 (PE Rat IgG2a, κ , referência 400508, *Biolegend*), e com o anticorpo monoclonal anti-IL10 PE (clone JES3-19F1, *Biolegend*), nos tubos A2 e B2. Salienta-se que, de forma a alcançar no mínimo 2 000 células B CD19⁺ e 10 000 células T CD3⁺ por aquisição, foram processados por amostra 2 a 3 tubos A2, de acordo com as contagens absolutas obtidas para estas populações celulares na avaliação de subpopulações linfocitárias. A análise representada na figura 21 do capítulo 3.4 – Análise de Resultados exemplificam a estratégia usada para a determinação da produção de IL-10 em células B e T.

3.3.7 Doseamento das concentrações séricas de IFN- γ e IL4

O doseamento dos níveis séricos de IFN- γ e IL4 foi efetuado com os kits de ELISA da *Biolegend* já referidos. Todos os reagentes usados nos ensaios foram fornecidos no respetivo kit. O protocolo recomendado pelo fabricante é similar para ambos os kits.

Assim, antes de cada ensaio, as microplacas com o respetivo anticorpo de captura, foram lavadas com o tampão de lavagem fornecido no kit (diluído a 1:10 com água destilada), programando-se o lavador automático para 4 lavagens, com dispensação de 300 μ L de tampão por poço. Todas as lavagens seguintes foram efetuadas desta forma. Depois de removidos quaisquer resíduos do tampão de lavagem, foram acrescentados a cada poço 50 μ L de *Matrix C* (para placas de IL-4) ou de *Assay Buffer A* (para placas de IFN- γ). O *Assay Buffer A* serviu também como amostra de branco para as placas de IL4 e IFN- γ . De seguida, 50 μ L de cada amostra (calibradores, controlos e amostras teste) foram acrescentadas a cada poço, de acordo com a programação da placa feita previamente. Para o IFN- γ , as amostras de calibração foram obtidas por diluições seriadas de uma solução-mãe fornecida no kit, com concentração de 1000 pg/mL (concentrações dos calibradores usados: 1,000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL e 15,6 pg/mL). Para a IL4, as amostras de calibração foram obtidas por diluições seriadas de uma solução-mãe fornecida no kit, com concentração de 200 pg/mL (concentrações dos calibradores usados: 200 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL, 6,3 pg/mL e 3,2 pg/mL). As placas foram então seladas com tira autocolante, e incubadas durante 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação a 200 rpm. Seguiu-se um novo passo de lavagem como anteriormente descrito. Um volume de 100 μ L de anticorpo de deteção (para IFN- γ ou IL4, conforme o ensaio) foi acrescentado a cada poço, e as placas foram novamente seladas e incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação a 200 rpm. Após a incubação, as placas foram lavadas, e em cada poço foi depois adicionada a solução com a enzima conjugada (*Avidina-HRP horse radish peroxidase*), que foi deixada em incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação a 200 rpm. Depois de um passo final de lavagem, agora mais demorado e com 5 repetições (em vez das 4 usadas até aqui) para minimizar os níveis de *background* das leituras, foi então adicionada a solução com o substrato 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (100 μ L em cada poço). A incubação, agora no escuro e sem agitação, demorou 15 minutos, após os quais se juntou finalmente a solução de paragem (solução Stop), 100 μ L em cada poço, de modo a parar a reação enzimática em curso. As placas foram então lidas duas vezes no leitor de microplacas, até 30 minutos após a adição da solução de paragem. Para cada amostra, as absorvâncias lidas a 450 nm foram corrigidas por subtração das respetivas leituras a 630 nm.

3.4 Análise de Resultados

3.4.1 Estratégias de Gating e análise de ficheiros – Citometria de Fluxo

Como referido anteriormente, os ficheiros resultantes da aquisição das amostras no citómetro de fluxo, foram arquivados como *list mode files* (formato FCS 2.0), mantidos na memória do computador e no disco de *backup* do equipamento.

A análise dos resultados foi realizada com recurso a dois programas de aquisição e análise: *MultisetTM* e *CellQuestProTM*. Estratégias booleanas foram definidas para a hierarquização das diferentes regiões e/ou subpopulações analisadas.

Para cada população ou subpopulação celular os resultados foram obtidos como percentagens (em relação a uma população-mãe definida de forma idêntica para todas as amostras analisadas), e como contagens absolutas (células/ μ L), derivadas direta ou indiretamente das contagens obtidas com o *kit BD IMK with Trucount tubes*.

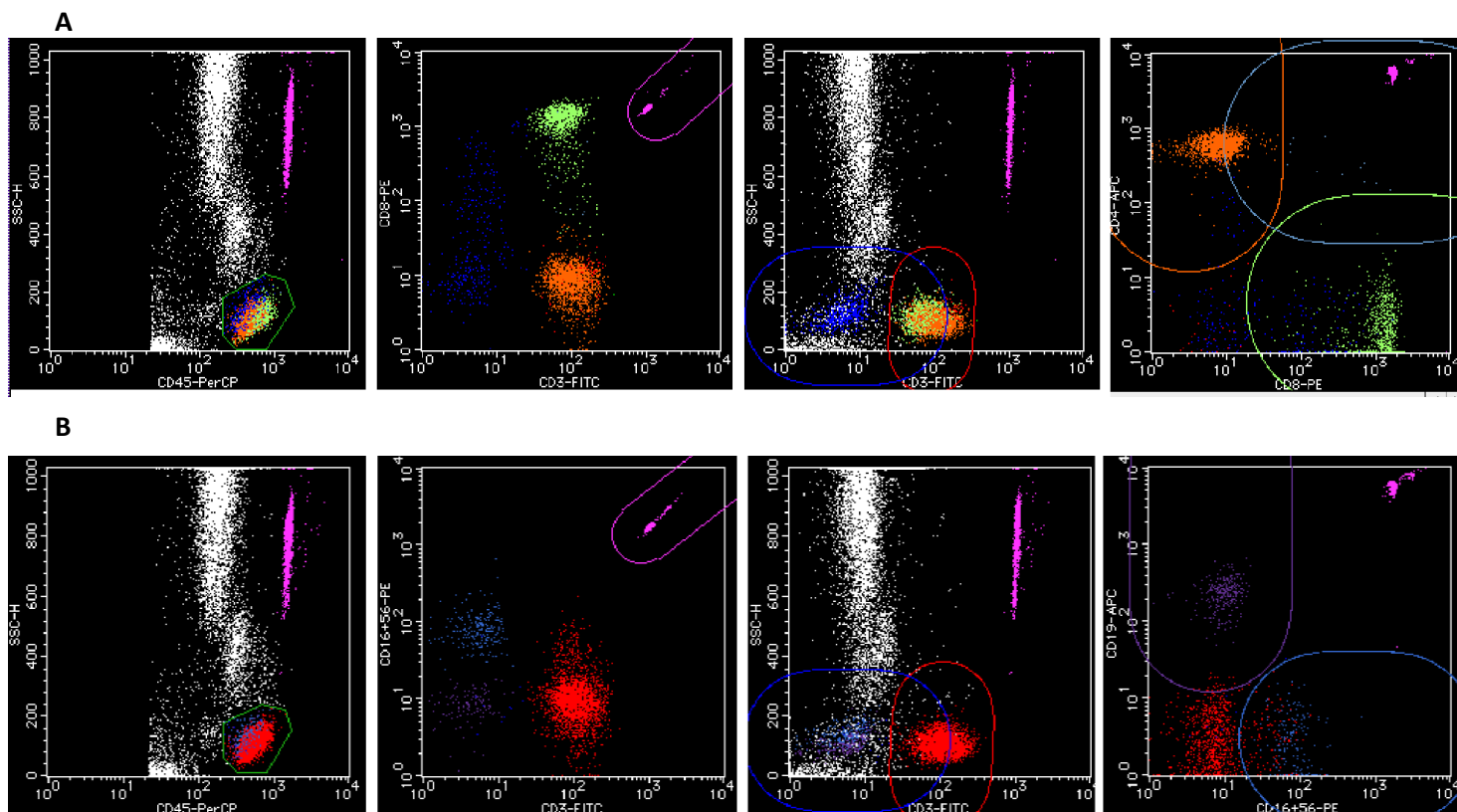
Para a avaliação das subpopulações de linfócitos, a análise automática (ou manual, sempre que necessário) foi realizada com o *software MultisetTM*. Os resultados, sob a forma de percentagens e valores absolutos foram calculados e fornecidos pelo equipamento segundo protocolos e cálculos internos. Resumidamente, e tal como se mostra na figura 12, dentro da região de linfócitos, identificada no *dot plot* CD45 vs SSC, foram identificadas as subpopulações de células T (CD3⁺), T auxiliadoras (CD3⁺CD4⁺), T citotóxicas (CD3⁺CD8⁺), B (CD19⁺) e NK (CD3⁻CD16/CD56⁺). Na Figura 12-A encontram-se identificadas as populações de células T, auxiliadoras (identificadas a cor laranja) e citotóxicas (identificadas a cor verde). Na figura 12-B encontram-se identificadas as populações de células T, B e NK, respetivamente identificadas a cor vermelha, roxa e azul. As esferas calibradas, usadas para efeitos de contagem em ambos os tubos, estão também identificadas em ambas as figuras na região identificada a cor rosa. A validação de cada ensaio implicou o cumprimento de três critérios: valor de linfossoma ≥ 97 ; diferença inferior a 10% entre os valores absolutos de linfócitos T CD3⁺ obtidos nos dois tubos analisados para cada amostra; e diferença inferior ou igual a 3, entre os valores percentuais de linfócitos T CD3⁺ obtidos nos dois tubos analisados para cada amostra.

Figura 12 – Estratégia de análise usada para a identificação de subpopulações linfocitárias, com o software Multiset™.

A. *Dot plots* representativos da análise efetuada no Tubo 1 (CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC).

B. *Dot plots* representativos da análise efetuada no Tubo 2 (CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC).

APC – Alofocianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, SSC – *Side Scatter*.

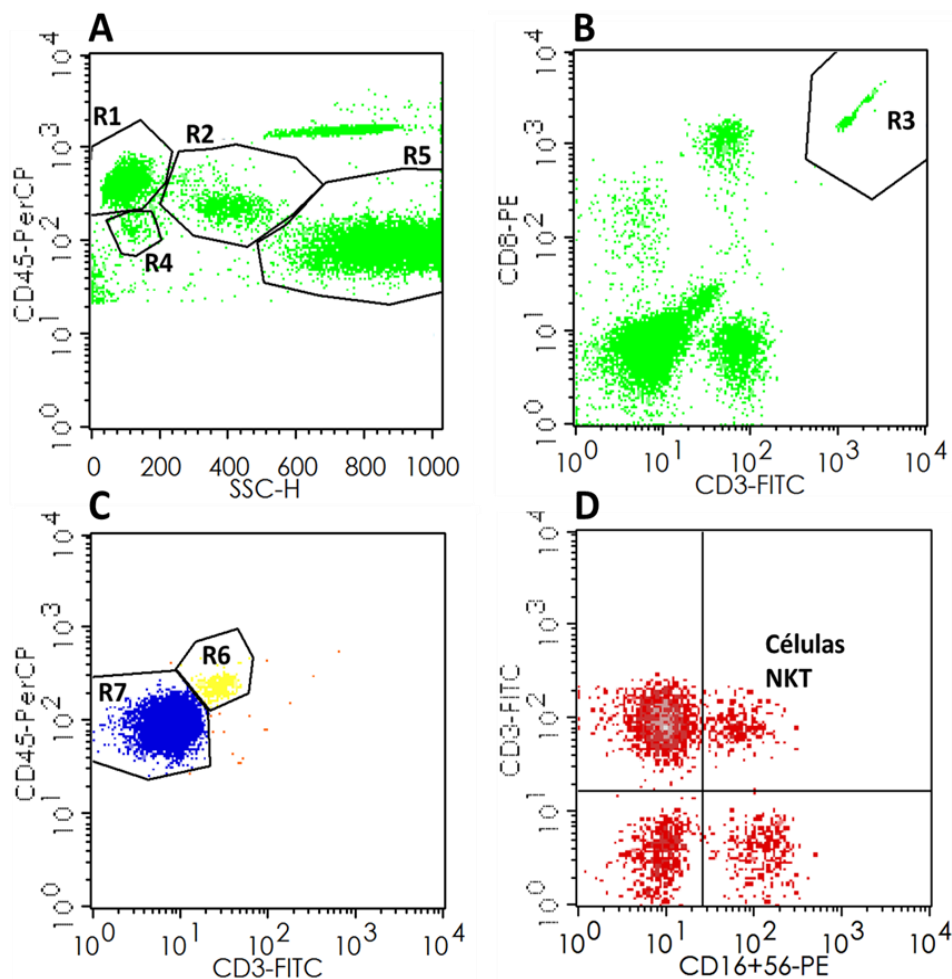


Para a identificação e análise dos leucócitos totais e respetivas populações celulares, o *software CellQuestPro™* foi usado, de acordo com a estratégia disposta na figura 13. As populações celulares foram identificadas de acordo com as suas características, num diagrama biparamétrico com CD45 vs SSC (figura 13-A). Assim, a região R1 corresponde aos Linfócitos ($CD45^{Hi}/SSC^{Low}$), a região R2 aos Monócitos ($CD45^{Hi}/SSC^{Interm}$), e a região R4, aos Basófilos ($CD45^{Interm}/SSC^{Low}$), classicamente abaixo dos linfócitos. A região R5, Granulócitos ($CD45^{Hi}/SSC^{Hi}$), incluía duas subpopulações celulares, que foram diferenciadas de acordo com a respectiva intensidade de autofluorescência: os Neutrófilos, em R7, com valores mais baixos, e os Eosinófilos, em R6, com valores mais elevados (figura 13-B). Também a população de células NKT ($CD3^{+} CD16/CD56^{+}$) foi caracterizada nesta fase, identificando-se como a população de linfócitos (R1) positiva para CD3 e CD16/CD56, com recurso a quadrantes, num *dot plot* de CD3 vs CD16/CD56 (figura 13-C). A população de esferas calibradas foi identificada de forma similar à observada com a análise do *software Multiset™*, num *dot plot* de FL1 vs FL2, neste caso, CD3 FITC vs CD8 PE (R3) (figura 13-D).

Figura 13 – Estratégia de análise usada para a identificação de subpopulações de leucócitos e células NKT, com o software *CellQuestPro™*.

A. Dot plot de CD45 vs SSC, com identificação de Linfócitos (R1), Monócitos (R2), Basófilos (R4) e Granulócitos (R5). **B.** Dot plot de CD8 vs CD3, com identificação da região R3, onde se encontra a população de esferas calibradas. **C.** Dot plot de CD45 vs CD3, com janela na região de Granulócitos (R5), para distinção das populações de Eosinófilos (R6) e Neutrófilos (R7). **D.** Dot plot de CD3 vs CD16/CD56, com janela em Linfócitos (R1), para identificação da população de células NKT (CD3⁺CD16/CD56⁺).

FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP – Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, SSC – Side Scatter.



Neste caso, os valores absolutos foram determinados com recurso a documento Excel, com fórmulas validadas em células protegidas. Assim, a partir do número de eventos adquiridos em cada uma das regiões de interesse e do valor total de esferas calibradas presentes nos tubos *Trucount* usados obteve-se o valor absoluto da respetiva população, tal como descrito na fórmula abaixo, baseada no cálculo automático efetuado pelo *software Multiset* para as subpopulações linfocitárias. Por exemplo, considerando que a população de interesse A se encontraria na região 1 (R1), e que a região 2 (R2) corresponderia às esferas calibradas adquiridas no mesmo tubo, a fórmula seria:

$$\text{Valor absoluto da população A (células}/\mu\text{L)} = \frac{n.^{\circ} \text{ de eventos adquiridos em R1}}{n.^{\circ} \text{ de eventos adquiridos em R2}} \times \frac{\text{esferas por tubo}^*}{\text{volume de amostra } (\mu\text{L})^{**}}$$

* Número de esferas calibradas, que se encontram liofilizadas em cada tubo *Trucount*. Este valor, próximo de 50 000, varia de lote para lote.

** Volume de sangue total pipetado para tubo em questão.

Os valores absolutos de cada subpopulação celular caracterizada a partir deste ponto foram obtidos com base no valor absoluto da respetiva população-mãe quantificada com este protocolo.

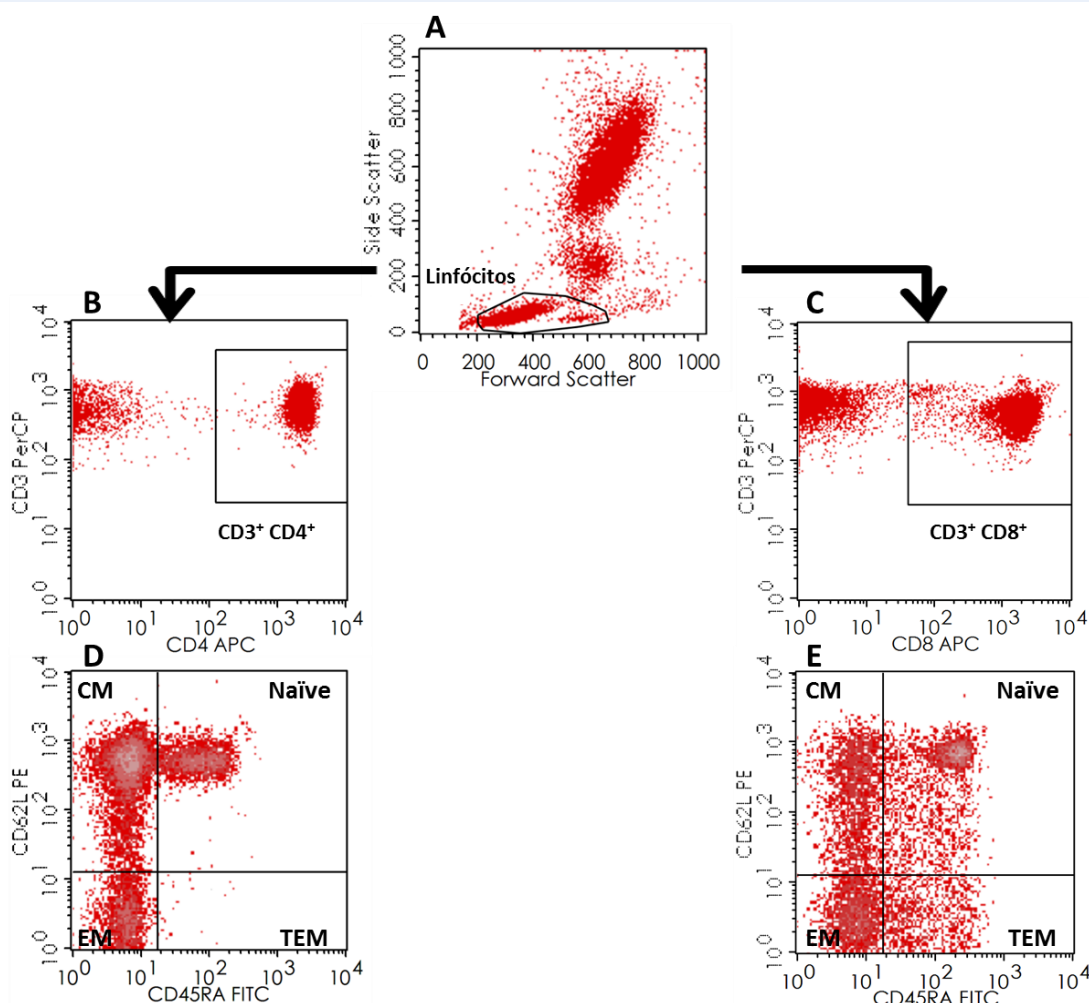
A estratégia de análise para avaliação do perfil maturativo de linfócitos T CD4 e CD8 está exemplificada na figura 14. Assim, dentro da janela de linfócitos, identificados num *dot plot* de SSC vs FSC, foi feita uma nova janela quer em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (células T auxiliaadoras), quer em linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (células T citotóxicas). Avaliou-se depois, com recurso a quadrantes, num *dot plot* de CD62L vs CD45RA, o perfil de maturação das células T, considerando a seguinte classificação:

- Células Naïve – CD45RA⁺CD62L⁺ (Q2);
- Células de Memória Central, CM – CD45RA⁻CD62L⁺ (Q1);
- Células de Memória Efetoras, EM – CD45RA⁻CD62L⁻ (Q3);
- Células de Memória Efetoras, com diferenciação terminal, TEM – CD45RA⁺CD62L⁻ (Q4).

Figura 14 – Estratégia de análise usada na caracterização do perfil maturativo dos linfócitos T, com o software CellQuestPro™.

A. *Dot plot* de SSC vs FSC, com identificação da região de Linfócitos. **B e C.** *Dot plots* de CD3 vs CD4 e CD3 vs CD8, onde as células T CD4 foram identificadas pela co-expressão de CD3 e CD4, dentro da janela de linfócitos, e as células T CD8 foram identificadas de modo semelhante, mas pela co-expressão de CD3 e CD8. **D e E.** *Dot plots* de CD62L vs CD45RA usados para a identificação das diferentes subpopulações celulares identificadas dentro das janelas de células T CD4 (CD3⁺CD4⁺) e T CD8 (CD3⁺CD8⁺).

CM – células de memória central; EM – células de memória efetoras; TEM – células de memória efetoras, com diferenciação terminal. APC – Alociocianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, FSC – *Forward Scatter*, PE – Ficoeritrina, PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, SSC – *Side Scatter*.



A percentagem de cada uma das subpopulações foi avaliada para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

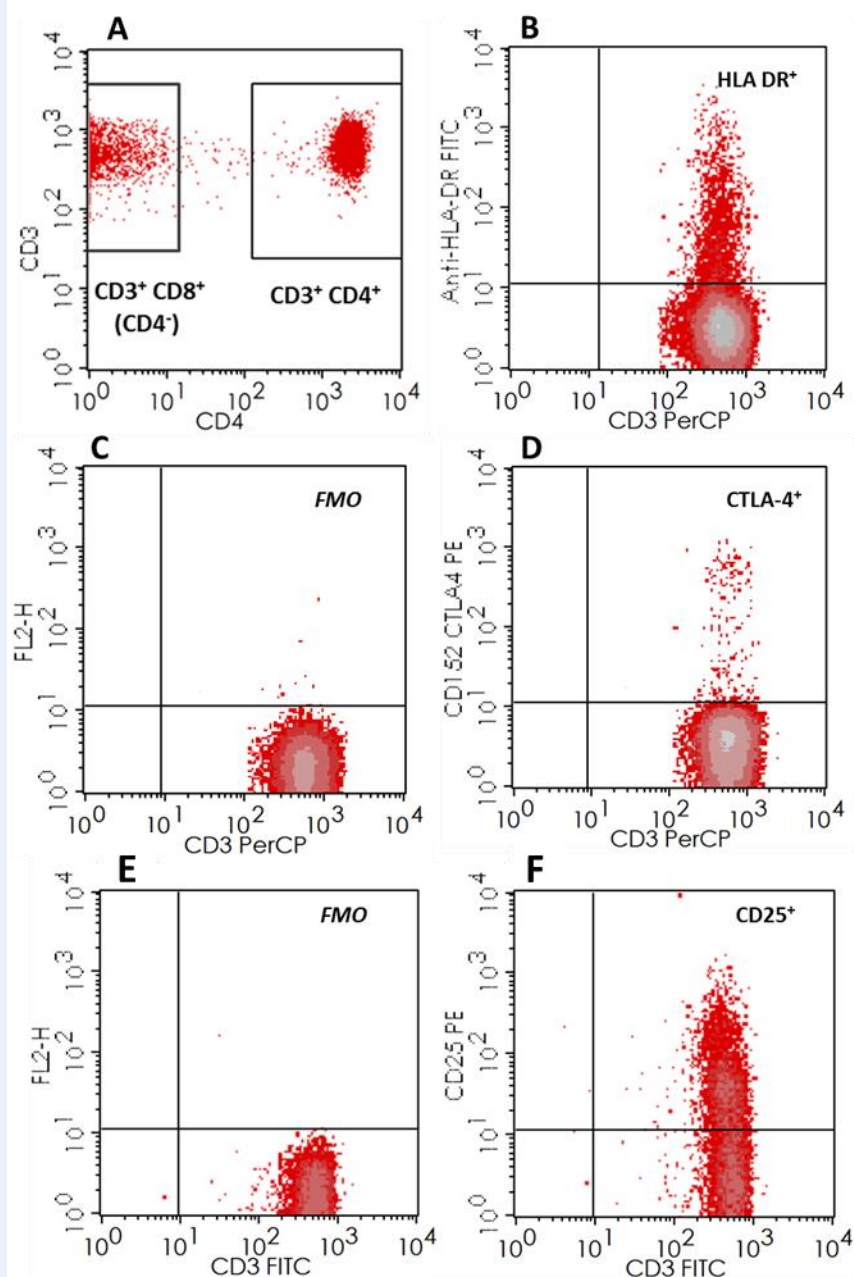
Uma estratégia de análise semelhante foi otimizada para a avaliação dos marcadores de ativação HLA-DR, CTLA-4 e CD25 (usando os tubos dos painéis 2 e 3), dentro da população de linfócitos T. Assim, considerando a janela de linfócitos identificada na figura anterior, foram depois isolados os linfócitos T (CD3⁺), divididos em células T CD4 (CD4⁺) e células T CD8 (CD4⁻), tal como consta do *dot plot* A da figura 15. A expressão dos marcadores de ativação foi avaliada dentro da população de linfócitos T totais, e nas respetivas subpopulações T CD4 e T CD8, considerando-se para esse efeito a percentagem de células positivas para o marcador em estudo, dentro de cada população.

Figura 15 – Marcadores de ativação de linfócitos T: estratégia de análise usada na avaliação da sua expressão com o software CellQuestPro™.

A. *Dot plot* de CD3 vs CD4, onde se procedeu à identificação das regiões CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺ CD4⁻ dentro dos Linfócitos T (previamente isolados como os eventos CD3⁺, dentro da região de Linfócitos). Não se incluíram os fluorocomas nos respetivos eixos, uma vez que no painel 2 se conjugou CD3 PerCP e CD4 APC, enquanto que no painel 3 a conjugação foi de CD3 FITC e CD4 PerCP Cy5.5. **B.** *Dot plot* de HLA-DR vs CD3, no qual se avaliou a expressão de HLA-DR, para cada subpopulação de linfócitos T estudada. **C e D.** Avaliação da expressão de CTLA-4, com recurso a tubo FMO, no do qual se delimitou o nível de fluorescência inespecífica, para posterior avaliação da positividade. **E e F.** Avaliação da expressão de CD25 (a partir dos tubos do painel 3), com estratégia semelhante à utilizada para avaliação da positividade de CTLA-4 (tubo FMO).

Cada um dos marcadores de ativação foi estudado nas populações de Linfócitos T CD3⁺, Linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e Linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (CD4⁻).

FMO – Fluorescence Minus One. FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila.

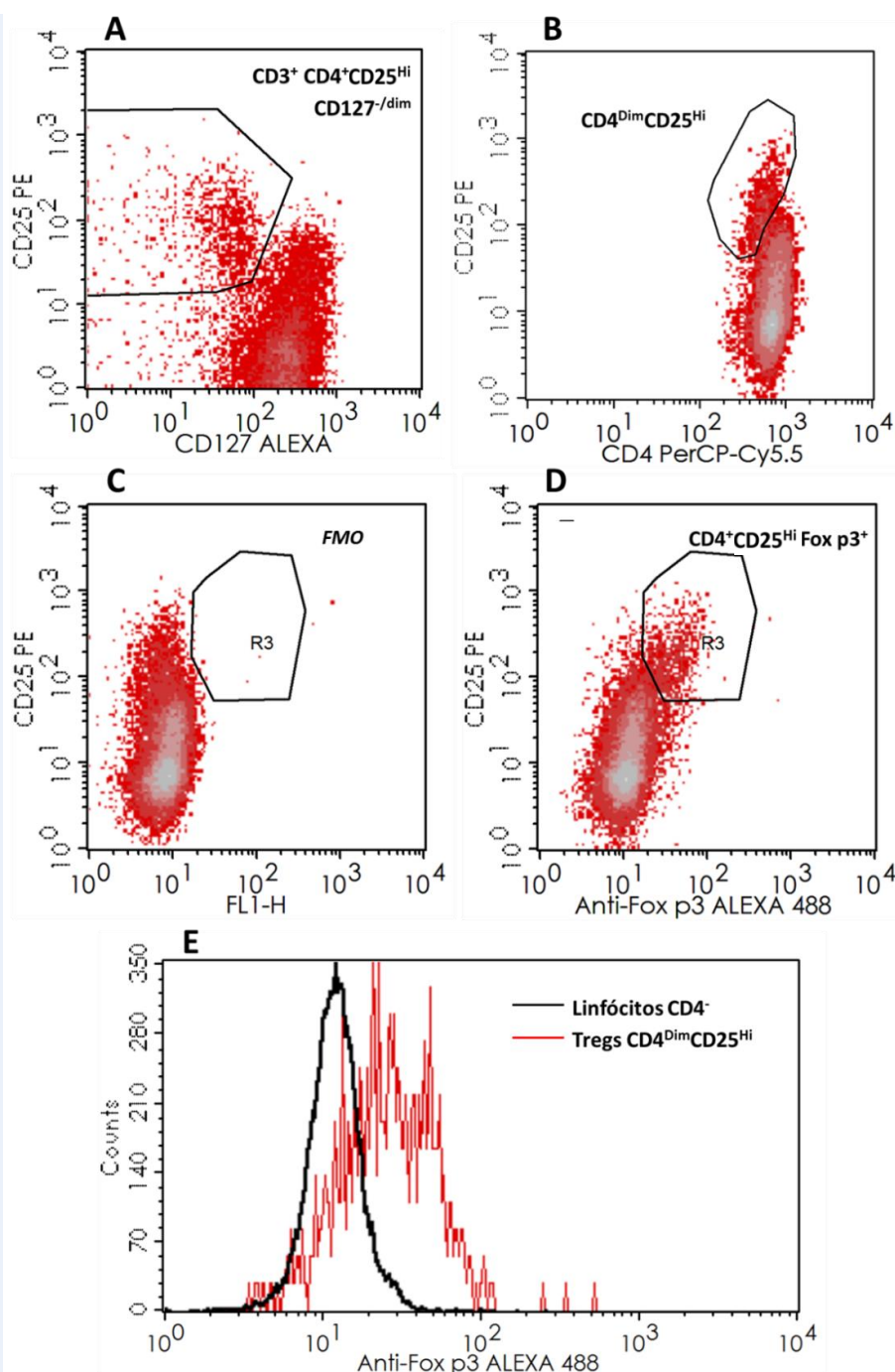


Para a avaliação das células Treg, isolaram-se inicialmente as células T CD4⁺ conforme descrito nas estratégias anteriores. Foram então usadas três estratégias distintas, identificando-se as células Treg CD4⁺CD25^{Hi}CD127^{-dim}, CD4⁺CD25^{Hi}Foxp3⁺ e CD4^{Dim}CD25^{Hi}, conforme exemplifica a figura 16. A percentagem de cada subpopulação dentro do total de células T CD4⁺ foi tida em consideração para a análise de resultados. Foi ainda apreciada a expressão de Foxp3 dentro da subpopulação de linfócitos Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi} como se mostra também na figura 16. Resumidamente, o que se fez foi avaliar a média geométrica da intensidade de fluorescência de Foxp3 nos linfócitos Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi} e nos linfócitos CD4⁻ (incluindo outros linfócitos T e B e células NK). Calculou-se então a razão entre estes dois valores, reportados em unidades MFI (*Mean Fluorescence Intensity*).

Figura 16 – Identificação de Linfócitos T reguladores e avaliação da expressão de Foxp3, com o software CellQuestPro™.

A. Dot plot de CD25 vs CD127, com a delimitação da região correspondente à população de células T reguladoras CD4⁺CD25^{Hi}CD127^{-dim}. **B.** Dot plot de CD4 vs CD25, mostrando a população de células T reguladoras com expressão forte de CD25, e com expressão mais fraca de CD4 (CD4^{Dim}CD25^{Hi}). **C e D.** Dot plots usados na identificação da população de células T reguladoras CD4⁺CD25^{Hi}Foxp3⁺. O primeiro dot plot é representativo do tubo FMO para Foxp3, a partir do qual se delimitou a região R3 usada para a identificação da população Foxp3⁺ dentro das células CD4⁺CD25^{Hi}. **E.** Histograma com avaliação da expressão de Foxp3 dentro da população de células T reguladoras CD4^{Dim}CD25^{Hi} (linha vermelha), que se encontra sobreposta à expressão nos linfócitos CD4⁻ (linha preta).

FMO – *Fluorescence Minus One*.
ALEXA – Alexa Fluor 647, ALEXA 488 – Alexa Fluor 488, Cy – Cianina, PE – Ficoeritrina, PerCP – Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, Treg – Células T reguladoras.



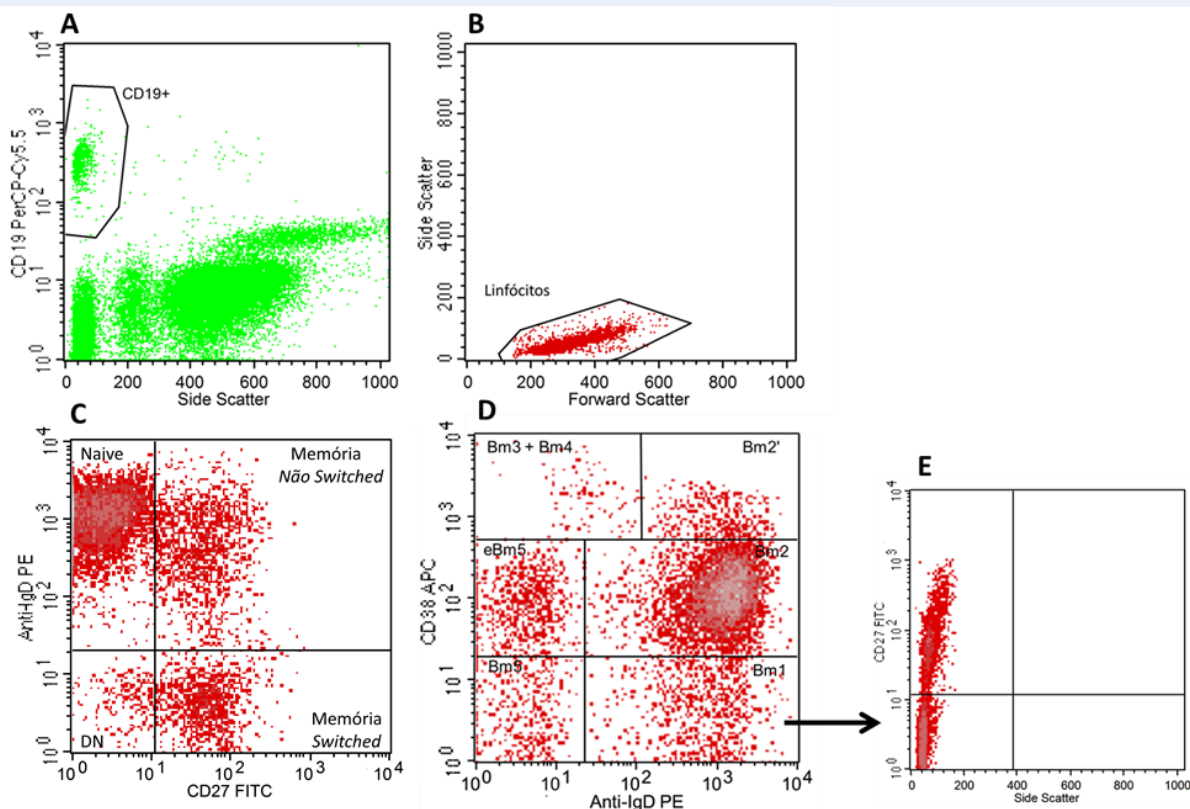
Esta estratégia teve como objetivo normalizar os valores analisados, de forma a reduzir o impacto da variabilidade diária na avaliação da expressão de Foxp3, como tem sido proposto na literatura para avaliações semelhantes por citometria de fluxo (501).

+6 Duas classificações foram utilizadas para a avaliação do perfil maturativo das células B. Concretamente, usou-se a avaliação clássica a partir da expressão de IgD e CD27, na qual as células B foram divididas em células B naïve, $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$; células B de memória, CD27^+ , posteriormente separadas em não *switched*/células da zona marginal (MZ), $\text{IgD}^+\text{CD27}^+$, e *switched*, $\text{IgD}^-\text{CD27}^+$; e células duplas negativas (DN), $\text{IgD}^-\text{CD27}^-$ (495, 496). A sua identificação está demonstrada na figura 17. Também na figura 17 se encontra exemplificada, no respetivo *dot plot*, a segunda classificação usada, classificação Bm1-5. Com esta estratégia de análise, a partir da expressão de IgD e CD38, identificaram-se seis subpopulações no compartimento de células B circulantes.

Figura 17 – *Dot plots* representativos da estratégia de análise usada para a caracterização do perfil maturativo dos linfócitos B, com o software CellQuestPro™.

A e B. Identificação de linfócitos B através da expressão de CD19, e subsequente purificação desta população com recurso à janela de linfócitos identificada num *dot plot* de SSC vs FSC. **C.** *Dot plot* representativo da classificação IgD/CD27 (células B naïve: $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$; células B de memória não *switched*: $\text{IgD}^+\text{CD27}^+$; células B de memória *switched*: $\text{IgD}^-\text{CD27}^+$; células B duplas negativas DN: $\text{IgD}^-\text{CD27}^-$). **D.** *Dot plot* representativo da classificação com a expressão de IgD e CD38 (Bm1-5). Foram identificados os compartimentos Bm1 ($\text{IgD}^+\text{CD38}^-$), Bm2 ($\text{IgD}^+\text{CD38}^+$), Bm2' ($\text{IgD}^+\text{CD38}^{\text{Hi}}$), Bm3+Bm4 ($\text{IgD}^-\text{CD38}^{\text{Hi}}$), eBm5 ($\text{IgD}^-\text{CD38}^+$) e Bm5 ($\text{IgD}^-\text{CD38}^-$). **E.** Avaliação da expressão de CD27 dentro da subpopulação Bm1, exemplificada num *dot plot* de CD27 vs SSC.

DN – Células B duplas negativas $\text{IgD}^-\text{CD27}^-$. APC – Alofocianina, Cy – Cianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, FSC – *Forward Scatter*, PE – Ficoeritrina, PerCP – Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, SSC – *Side Scatter*.



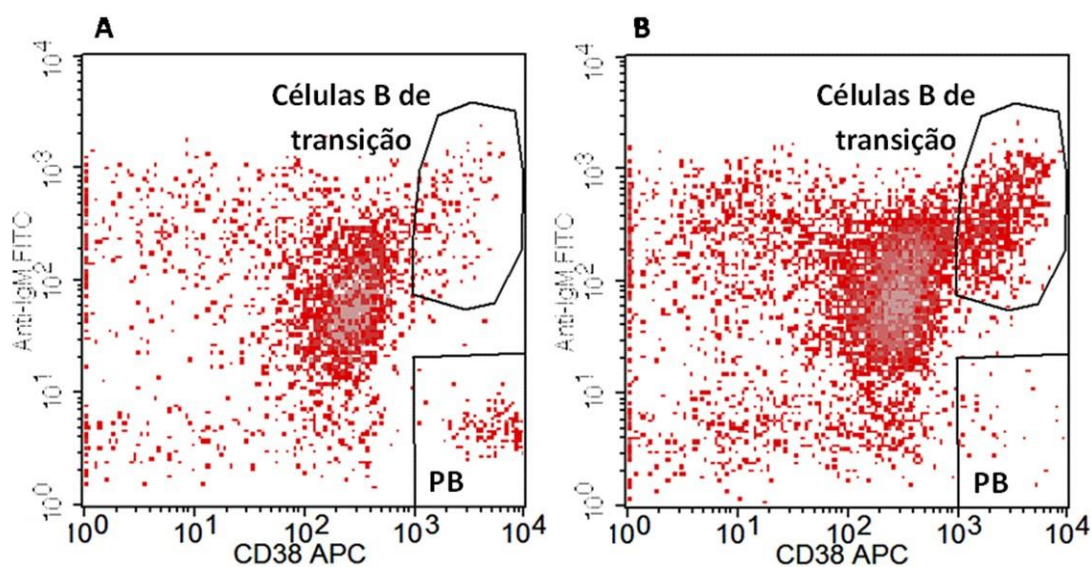
Assim, identificaram-se células B de transição (Bm2': IgD⁺CD38^{Hi}), células B naïve (Bm2: IgD⁺CD38⁺), células B de memória não *switched* (Bm1: IgD⁺CD38⁻), células B de memória *switched* (IgD⁻CD38^{+/-}), entretanto divididas em células pós centro germinativo (*early* e Bm5: IgD⁻CD38⁺) e células de memória em repouso (*late* Bm5: IgD⁻CD38⁻), e ainda plasmablastos (Bm3+Bm4: IgD⁻CD38^{Hi}) (116, 333, 497, 498). Foi ainda avaliada a expressão de CD27 dentro da subpopulação de células Bm1, tal como representado na figura 17.

Através da expressão de IgM e CD38 foram ainda caracterizadas, de forma alternativa, as populações de células B de transição (IgM^{Hi}CD38^{Hi}) e plasmablastos (IgM^{+/-}CD38^{Hi}), também representadas na figura 18.

Figura 18 – Estratégia de análise usada para a caracterização de células B de transição e plasmablastos (PB), com o software CellQuestPro™.

A e B. Dot plots de IgM vs CD38, representativos da identificação das subpopulações de células B de transição (IgM^{Hi}CD38^{Hi}) e Plasmablastos (IgM^{+/-}CD38^{Hi}) em duas amostras distintas.

PB – Plasmablastos, APC – Alociocianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína.

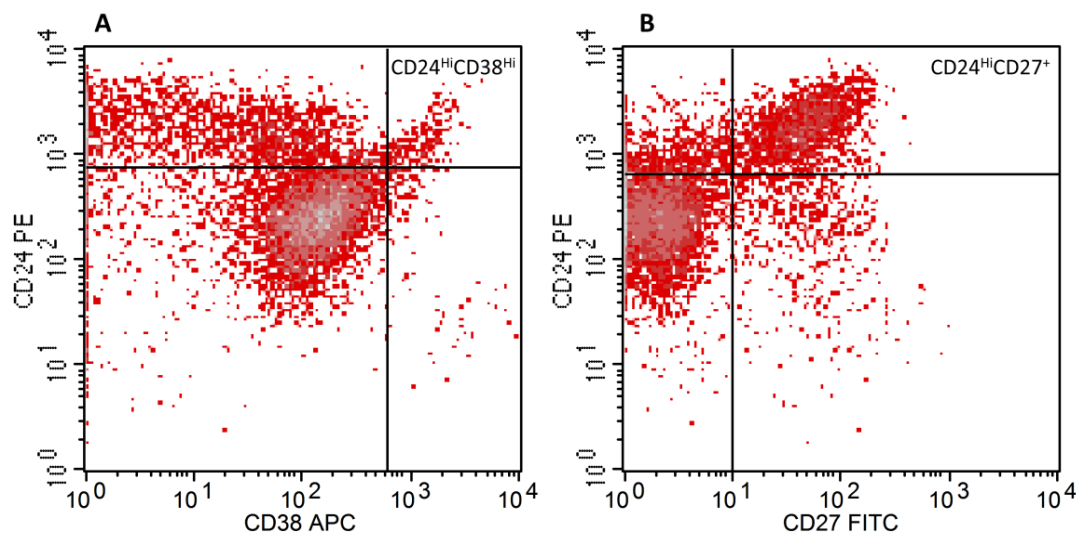


Neste trabalho, um dos objetivos principais foi o estudo das subpopulações de células B com funções reguladoras, abordadas através da caracterização das subpopulações de células de transição CD24^{Hi}CD38^{Hi} e de células B10 CD24^{Hi}CD27⁺ (116). A estratégia de análise disposta na figura 19 foi aplicada a todas as amostras, para obtenção dos valores percentuais de ambas as populações em relação ao total de células B.

Figura 19 – Estratégia de análise usada para a caracterização dos linfócitos B reguladores, com o *software* CellQuestPro™.

- A.** Dot plot de CD24 vs CD38, com a identificação da subpopulação de células B reguladoras CD24^{Hi}CD38^{Hi}.
B. Dot plot de CD24 vs CD27, com a identificação da subpopulação de células B reguladoras CD24^{Hi}CD27⁺.

APC – Alofocianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina.



Finalmente, as figuras 20 e 21 representam a estratégia de análise usada para avaliação da produção de citocinas em diferentes subpopulações de linfócitos.

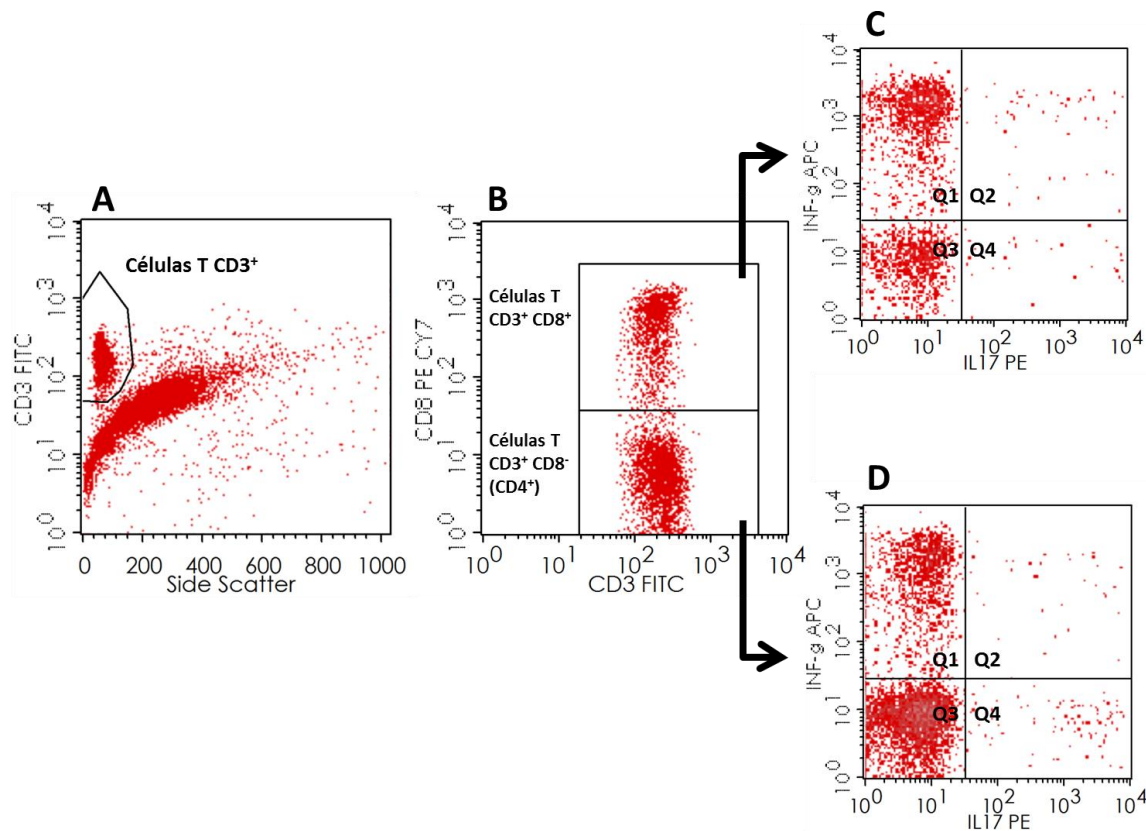
Para a avaliação da expressão de IFN- γ e IL17, a figura 20 exemplifica a identificação de linfócitos T através da expressão de CD3, ao que se seguiu a sua separação em células T CD8⁺ e CD8⁻ (correspondendo esta à população de células T CD4⁺). Não se identificando qualquer produção de citocinas nas condições não estimuladas, foram selecionados os tubos B2 para exercer a função de controlo de fluorescência, a partir dos quais se delimitaram as posições dos quadrantes usados depois na avaliação das citocinas nos respetivos tubos A2.

Neste protocolo foram avaliadas as células T CD4 (CD3⁺CD8⁻) e T CD8 (CD3⁺CD8⁺) para a produção de IFN- γ e IL17 nas seguintes condições: células IFN- γ ⁺IL17⁻ (Q1), células IFN- γ ⁺IL17⁺ (Q2), células IFN- γ ⁻IL17⁺ (Q4), células IFN- γ ⁺IL17^{+/-} (Q1+Q2), e células IFN- γ ^{+/-}IL17⁺ (Q2+Q4). As células do Q1 foram consideradas como Th1 (dentro dos T CD4) e Tc1 (dentro dos T CD8); as células do Q4 foram consideradas como Th17 (dentro dos T CD4) e Tc17 (dentro dos T CD8); e as células do Q2 foram consideradas como células polifuncionais produtoras de IFN- γ e IL17 (dentro dos T CD4 e dentro dos T CD8).

Figura 20 – Estratégia de análise usada para a avaliação da produção de IFN- γ e IL17 nas subpopulações de linfócitos T, após estimulação com PMA e ionóforo de cálcio, com o *software* CellQuestProTM.

A. Dot plot de CD3 vs SSC, onde as células T foram identificadas através da expressão de CD3. **B.** Dot plot de CD8 vs CD3, com os eventos previamente isolados na janela de células T CD3⁺, usado na distinção das subpopulações de células T CD8⁺ e CD8⁻ (CD4⁺). **C e D.** Avaliação da expressão de IFN- γ e IL17 em dot plots que combinam ambas as citocinas nos seus eixos. A análise foi efetuada dentro das subpopulações de células T CD8⁺ e CD8⁻ (CD4⁺) com recurso à análise de quadrantes, quantificando-se as células IFN- γ ⁺IL17⁻ (Q1), células IFN- γ ⁺IL17⁺ (Q2), células IFN- γ ⁻IL17⁺ (Q4), células IFN- γ ⁻IL17⁻ (Q3), e células IFN- γ ^{+/+}IL17⁺ (Q1+Q2), e células IFN- γ ^{+/+}IL17⁺ (Q2+Q4).

PMA – Acetato de forbolmiristato, APC – Alofocianina, Cy – Cianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila, SSC – Side Scatter.

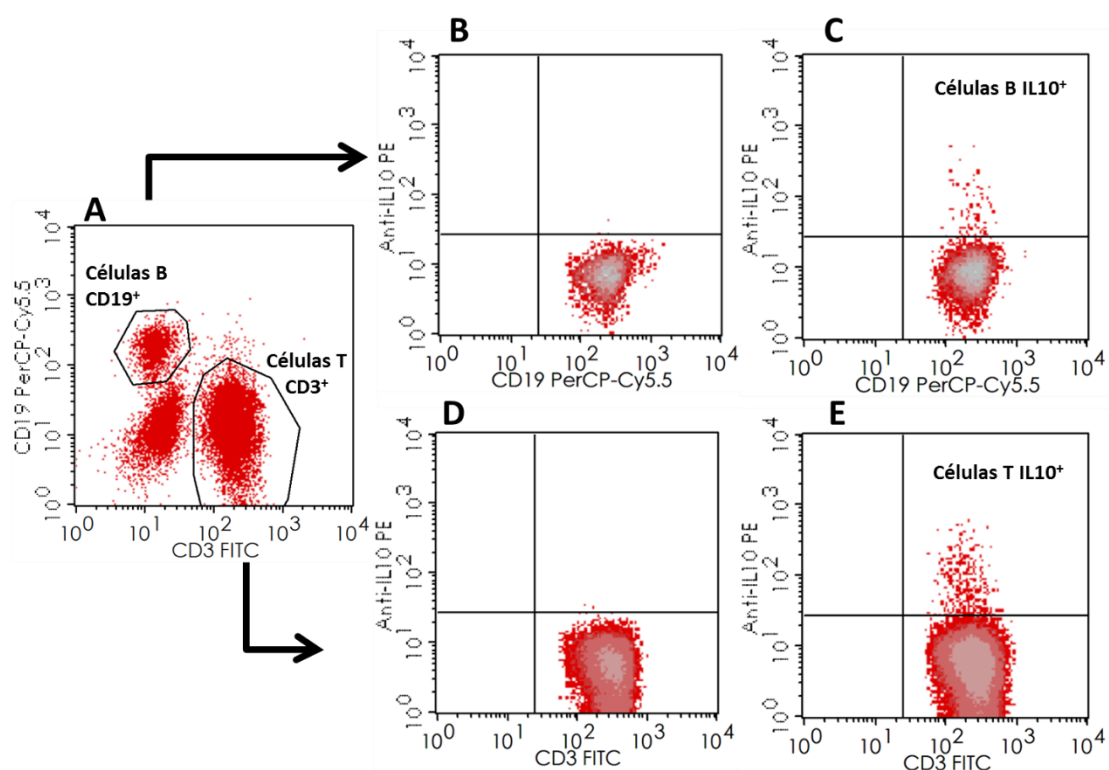


A análise da expressão de IL10 foi semelhante para as subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8, acrescentando-se no entanto a avaliação desta citocina nas populações de linfócitos T e B totais. Em suma, cada uma das populações-mãe foi identificada como disposto na figura 21, seguindo-se depois a identificação das células IL10⁺ dentro de cada compartimento. Para isso, e de forma similar ao efetuado para IFN- γ e IL17, os tubos B2, com células não estimuladas, funcionaram como controlos de fluorescência, onde se estimou para cada amostra, o limite de positividade.

Figura 21 – Estratégia de análise usada para a avaliação da produção de IL10 em linfócitos T e B, após estimulação com PMA, ionóforo de cálcio e LPS, com o software *CellQuestPro™*.

A. As células T e B foram identificadas de acordo com a imagem representada no *dot plot* de CD19 vs CD3 pela sua expressão de CD3 e C19, respetivamente. **B e C.** *Dot plots* de IL10 vs CD19, onde se avaliou a expressão de IL10 em linfócitos B não estimulados - controlo negativo (B) e linfócitos B estimulados (C). **D e E.** *Dot plots* de IL10 vs CD3, onde se avaliou a expressão de IL10 em linfócitos T não estimulados - controlo negativo (D) e linfócitos T estimulados (E). Em ambos os casos, a delimitação dos quadrantes para a avaliação da produção IL10 pelas células estimuladas foi feita com base nos níveis basais observados com células não estimuladas. Foi avaliada de forma idêntica a produção de IL10 pelas células T CD4 e T CD8.

LPS – Lipopolissacárido bacteriano, PMA – Acetato de forbolmiristato. Cy – Cianina, FITC – Isotiocianato de fluoresceína, PE – Ficoeritrina, PerCP - Proteínas do complexo Peridina-Clorofila.



Estratégias de análise e obtenção de resultados - ELISA

Após a leitura das placas a 450nm e 630nm no leitor de placas, os resultados das absorvâncias fornecidos pelo equipamento (já com a correção das leituras com o filtro de 630 nm), foram processados com o *software Logit regression V21042005*, disponível para Excel em www.xs4all.nl/~ednieuw (ednieuw.home.xs4all.nl/Calibration/Logit/Logit.htm). Este *software* de uso gratuito utiliza um algoritmo de modulação de curvas através de regressão linear. Assim, a média dos duplicados do branco de cada placa foi subtraída a todas as leituras da respetiva placa, e com as leituras corrigidas dos calibradores foi delineada a curva de calibração, tornada linear pelo programa.

Um valor mínimo de $r=0,9900$ (coeficiente de correlação entre os diferentes pontos da curva) foi usado como critério de aceitação das curvas de calibração, juntamente com a avaliação das

amostras de controlo incluídas em cada placa (controlos comerciais de concentração conhecida e/ou amostras já processadas em corridas anteriores, usadas também para avaliar a variabilidade inter-ensaios). De uma forma geral, as amostras foram ensaiadas numa corrida única, com leituras em duplicado, sendo aceites valores de coeficiente de variação (CV) inferiores a 15%. Sempre que esta condição não se cumpriu, as amostras foram reanalisadas. Aproximadamente 10% das amostras ensaiadas foram corridas em duplicado, utilizando-se os mesmos critérios na validação dos resultados. Desde que o critério de CV inferior a 15% se tenha cumprido, foram usados os valores médios das determinações para cada amostra. As amostras das diferentes avaliações temporais (T1, T2 e T3) de cada mulher dos grupos GA e GS foram ensaiadas na mesma placa, de forma a reduzir o impacto das variações entre corridas na sua análise e comparação. Deste modo, robusteceu-se a avaliação das variações longitudinais observadas, em cada mulher, nas concentrações das citocinas doseadas. Sempre que possível, foram incluídas amostras dos vários grupos na mesma placa, de forma a reduzir o impacto da variação inter-ensaio na comparação dos grupos.

O limite mínimo de deteção de um ensaio representa a concentração mais baixa (do respetivo analito) necessária para produzir um sinal claramente distinto do branco. De acordo com o respetivo fabricante, o limite mínimo de deteção para o *kit* de doseamento de IFN- γ era 5,6 pg/mL, e o limite mínimo de deteção para o *kit* de doseamento de IL4 era 0,6 pg/mL. Para efeitos de análise estatística, considerando as limitações de sensibilidade de cada *kit*, às amostras com valores abaixo do limite mínimo de deteção foi atribuído um valor correspondente à metade do respetivo limite mínimo de deteção.

3.4.2 Análise estatística

Foi efetuada uma caracterização demográfica e antropométrica das mulheres incluídas no estudo. Para as variáveis categóricas, os resultados foram expressos como frequências absolutas e frequências relativas, sempre que aplicável. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui-Quadrado ou com o teste exato de Fisher, quando aplicável. Ambos os testes foram efetuados após construção de tabelas de contingência, relacionando cada uma das variáveis com os grupos em estudo (GA, GS, NGA e NGS). Ainda nesta caracterização, os resultados de variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentados como média \pm desvio-padrão. Caso contrário, os resultados apresentaram-se como mediana e intervalo interquartil. Para a identificação de diferenças entre os grupos GA, GS, NGA e NGS, foi aplicada ANOVA I na comparação de variáveis cuja distribuição subjacente aos dados verificou as condições de normalidade, caso contrário aplicou-se o respetivo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Sempre que se observaram diferenças estatisticamente significativas, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey (para variáveis com distribuição normal) e de Dunn (para variáveis que não verificaram as condições de normalidade) à variável em estudo. Quando apenas dois grupos foram comparados (concretamente nas variáveis exclusivas de mulheres GA e GS, ou de mulheres GA e NGA), para variáveis cuja distribuição subjacente aos dados verificou as condições de normalidade, aplicou-se o teste *t* de Student para amostras independentes. Caso contrário foi aplicado o respetivo teste não paramétrico de Mann-Whitney U.

Na avaliação laboratorial, para os vários parâmetros imunológicos analisados, com a aplicação do teste de Shapiro-Wilk rejeitou-se a hipótese de normalidade da população subjacente aos dados. Os resultados encontram-se por isso apresentados sob a forma de mediana e intervalo

interquartil, e a comparação dos diferentes parâmetros imunológicos foi feita por aplicação de testes não paramétricos. Para analisar diferenças nos parâmetros imunológicos entre cada 2 grupos independentes foi utilizado o teste de Mann-Whitney U (concretamente nas comparações NGA vs NGS, GA vs NGA*, e GS vs NGS* e GA vs GS*). As comparações assinaladas com * foram efetuadas para as avaliações temporais 1 e 3 de mulheres GA e de mulheres GS.

Nos grupos GA e GS, foram ainda confrontados os dados das diferentes avaliações temporais (T1, T2 e T3). Desta forma, para estudar diferenças nos parâmetros imunológicos ao longo da avaliação longitudinal de cada um dos grupos, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman, para dados emparelhados. O teste não paramétrico de Wilcoxon (*signed-ranks*) foi posteriormente aplicado para a comparação dos parâmetros imunológicos entre as avaliações T1 e T3 apenas.

Após aplicação do teste de Shapiro-Wilk aos subgrupos analisados dentro das GA, rejeitou-se a hipótese de normalidade da população subjacente aos dados. Os resultados encontram-se por isso apresentados sob a forma de mediana e intervalo interquartil. Os parâmetros imunológicos entre subgrupos de mulheres GA foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney U. A avaliação antropométrica e demográfica destes subgrupos foi efetuada de acordo com o descrito anteriormente para a amostra total.

De forma a elucidar se os parâmetros imunológicos com diferença estatisticamente significativa entre GA com e sem intercorrências alérgicas na descendência poderiam prever exatamente o desenvolvimento dessas manifestações de risco para a atopia, a associação entre estes parâmetros e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência foi consequentemente analisada. Através da utilização de curvas ROC (*Receiver operating characteristic*), foram estudados níveis de *cut-off* para potencial utilização destes parâmetros como marcadores preditivos de atopia. Com estes valores, foram aplicados o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando aplicável) em tabelas de contingência, onde se avaliaram as respetivas *Odds-ratio* (OR) e intervalos de confiança, e em paralelo a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo para cada parâmetro estudado como marcador de risco. Este estudo foi completado com aplicação de um modelo de regressão logística bivariada.

Para todos os testes utilizados, foram considerados significativos valores-p inferiores a 0,05. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao *software GraphPad Prism* software, versão 6.01 para *Windows* e *Mac* (*GraphPad Software*, La Jolla, California, USA, <http://www.graphpad.com>), A representação gráfica dos resultados foi efetuada também com o *software GraphPad Prism*, sob a forma de gráficos *boxplot*, segundo Tukey, para a comparação dos grupos, sempre que aplicável, e sob a forma de curvas ROC. Para a construção do modelo de regressão logística binária, aplicado à avaliação dos marcadores de risco, utilizou-se o programa SPSS, versão 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp). Parte da análise estatística, concretamente o que se relaciona com a avaliação de fatores de risco, foi realizada em colaboração com o Dr. Tiago Domingues, no âmbito do Mestrado em Biostatística da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

4. Resultados

4.1 Caracterização antropométrica e demográfica da população

Foram recrutadas 135 mulheres com critérios para serem incluídas num dos 4 grupos do estudo: grávidas atópicas - GA, não grávidas atópicas - NGA, grávidas saudáveis - GS e não grávidas saudáveis - NGS.

Como se descreve na figura 22, uma das mulheres do grupo GS desistiu após a primeira avaliação T1, não tendo sido por isso considerada em nenhuma das avaliações do estudo. Por motivos relacionados com a localização do parto num hospital distinto daquele em que o estudo foi aprovado, não foram colhidas na avaliação T2 (parto) amostras de 1 mulher do grupo GS e de 5 mulheres do grupo GA. Os dados referentes ao parto dessas mulheres foram obtidos por entrevista com o clínico que as acompanhou ao longo do estudo, no momento da terceira avaliação (pós-parto).



Figura 22 – Participação das mulheres recrutadas em cada grupo ao longo das várias etapas do estudo. GA – mulheres grávidas atópicas, GS – mulheres grávidas saudáveis, NGA – mulheres não grávidas atópicas, NGS – mulheres não grávidas saudáveis, T1 – avaliação temporal 1 (3.º trimestre de gravidez), T2 – avaliação temporal 2 (parto), T3 – avaliação temporal 3 (6 semanas após o parto).

A tabela 5 apresenta as características antropométricas e demográficas da população do estudo.

Dos resultados da análise estatística aos 4 grupos de mulheres do estudo, há a assinalar diferenças estatisticamente significativas ao nível do índice de massa corporal (IMC) e da paridade. Em relação ao IMC, o teste de Kruskal-Wallis apresentou um valor-p significativo, assinalando diferenças entre os grupos, que foram de seguida analisadas pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Assim, as mulheres grávidas apresentaram efetivamente valores de IMC mais elevados ($p < 0.0001$ para GS vs NGS, e para GA vs NGS; $p = 0.0009$ para GA vs NGA).

Tabela 5 – Caracterização demográfica e antropométrica dos grupos de mulheres recrutadas.

COMPARAÇÃO ENTRE OS 4 GRUPOS	GA n=24	NGA n=32	GS n=43	NGS n=35	Valor-p
Idade em anos, mediana (Q1-Q3)					
	34 (32-36)	36 (31-37)	32 (30-35)	35 (32-36)	0,0633 ^a
Etnia, n (%)					
Caucasiana	24 (100,0)	32 (100,0)	42 (97,7)	35 (100,0)	0,5454 ^b
Negra	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,3)	0 (0,0)	
IMC em kg/m ² , mediana (Q1-Q3)					
	26,2 (24,7-29,2)	21,9 (20,7-25,7)	25,6 (23,8-27,9)	21,1 (20,1-22,5)	<0,0001 ^a
Paridade, n (%)					
Nulíparas	12 (50,0)	13 (40,6)	24 (55,8)	5 (14,3)	0,0017 ^b
Múltiparas	12 (50,0)	19 (59,4)	19 (44,2)	30 (85,7)	
Pressão sistólica em mmHg, mediana (Q1-Q3)					
	110 (103-123)	110 (105-120)	114 (110-120)	118 (112-125)	0,0036 ^a
Pressão diastólica em mmHg, mediana (Q1-Q3)					
	65 (61-72)	70 (60-73)	66 (61-72)	75 (69-79)	<0,0001 ^a
Nível de Escolaridade, n (%)					
Básico ou Secundário	2 (8,3)	5 (16,1)	4 (9,3)	7 (2,3)	0,2956 ^b
Superior	22 (91,7)	26 (83,9)	39 (90,7)	23 (76,7)	

^a Teste de Kruskal-Wallis, ^b Teste de Qui-quadrado GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil, sd – desvio padrão, T1 – avaliação temporal 1 (3.º trimestre de gravidez), T2 – avaliação temporal 2 (parto), T3 – avaliação temporal 3 (6 semanas após o parto).

Quanto à paridade, a distribuição de nulíparas e múltiparas dentro de cada grupo demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Na subsequente comparação dos grupos 2 a 2, destacou-se apenas o grupo de mulheres NGS, com menos nulíparas, tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas na sua comparação com os restantes grupos ($p=0,0002$ vs GS; $p=0,0041$ vs GA; $p=0,0260$ vs NGA; teste exato de Fisher).

Em relação aos valores de pressão sistólica e diastólica, encontrou-se diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos. A posterior comparação dos grupos dois a dois, com o teste de Dunn, permitiu encontrar diferenças apenas entre os grupos de mulheres NGA e NGS e entre os grupos de mulheres GA e NGS. Assim, as mulheres do grupo NGS apresentaram valores mais elevados que as mulheres do grupo NGA ($p=0,0029$ para pressão sistólica; $p=0,0001$ para pressão diastólica) e apresentaram também valores de pressão diastólica mais elevados do que mulheres do grupo GA ($p=0,0007$).

A tabela 6 sumariza as características antropométricas e demográficas exclusivas dos grupos de mulheres grávidas.

Tabela 6 – Caracterização demográfica e antropométrica dos grupos de mulheres grávidas.

	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
Idade Gestacional (semanas) na avaliação T1, média (sd)			
	33,8 (0,9)	33,1 (1,1)	0,2647 ^a
Idade Gestacional (semanas) na avaliação T2 em semanas, média (sd)			
	38,8 (1,1)	38,5 (1,1)	0,2959 ^a
Dias após parto na avaliação T3, mediana (Q1-Q3)			
	44 (42-50)	44 (42-47)	0,5894 ^b
Exposição passiva ao fumo do tabaco na gravidez, n (%)			
Sim	3 (12,5)	7 (16,3)	1,0000 ^c
Não	22 (91,7)	36 (83,7)	
Tipo de parto, n (%)			
Vaginal	13 (54,2)	18 (41,9)	0,4443 ^c
Cesariana	11 (45,8)	25 (58,1)	
Bebé: peso ao nascer em gramas, média (sd)			
	3262 (329)	3199 (402)	0,4931 ^a
Bebé: sexo, n (%)			
Masculino	12 (50,0)	21 (48,8)	1,0000 ^c
Feminino	12 (50,0)	22 (51,2)	
Pressão sistólica na avaliação T3 em mmHg, mediana (Q1-Q3)			
	111 (105-120)	116 (111-125)	0,0357 ^b
Pressão diastólica na avaliação T3 em mmHg, mediana (Q1-Q3)			
	69 (65-70)	69 (64-74)	0,4438 ^b
IMC na avaliação T3 em kg/m², mediana (Q1-Q3)			
	23,8 (21,9-25,8)	22,8 (21,1-25,1)	0,1291 ^b
Amamentação na avaliação T3, n (%)			
Sim	23 (95,8)	33 (76,7)	0,0816 ^c
Não	1 (4,2)	10 (23,3)	
Contraceção na avaliação T3, n (%)			
Sim	18 (75,0)	38 (88,4)	0,1824 ^c
Não	6 (25,0)	5 (11,6)	

^a teste t de Student não emparelhado, ^b teste de Mann-Whitney U, ^c teste exato de Fisher

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil, sd – desvio padrão, T1 – avaliação temporal 1 (3.º trimestre de gravidez), T2 – avaliação temporal 2 (parto), T3 – avaliação temporal 3 (6 semanas após o parto).

A avaliação dos dados obstétricos dos dois grupos de mulheres grávidas, GA e GS, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os parâmetros avaliados, com exceção dos valores de pressão sistólica após o puerpério, mais elevados nas mulheres GS. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação aos recém-nascidos de ambos os grupos no que se refere a peso e sexo.

Em relação às mulheres atópicas (grupos GA e NGA), todas se encontravam controladas de acordo com os critérios atuais (GINA, 2015) (396). Todas as mulheres atópicas se encontravam igualmente sobre terapêutica com corticosteroides inalados (ICS), dose baixa a média, ≤ 320 µg

fluticasona/dia ou equivalente, ou ICS+LABA, com ou sem antileucotrienos. Não houve diferenças significativas na distribuição quanto à terapêutica entre os grupos de mulheres atópicas (GA e NGA). Não se verificou diferença estatisticamente significativa para a presença de eczema atópico entre mulheres dos grupos GA e NGA, tendo-se documentado a presença de eczema atópico em 4 mulheres GA (16,7%) e em 6 mulheres NGA (18,8%) ($p=1,0000$; teste exato de Fisher). Em relação à sensibilização, todas as mulheres dos grupos GA e NGA se encontravam sensibilizadas para aeroalergénios, com a distribuição dos alergénios mais frequentes disposta na tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização do padrão de sensibilização em grávidas atópicas e não grávidas atópicas.

COMPARAÇÃO ENTRE GA E NGA	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
Sensibilização para aeroalergénios, n (%)			
<i>D. pteronyssinus</i>	15 (62,5)	21 (65,6)	1,0000 ^a
<i>D. farinae</i>	12 (50,0)	18 (56,3)	0,7875 ^a
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	2 (8,3)	9 (28,1)	0,0925 ^a
Pólenes de gramíneas	25 (20,8)	14 (43,8)	0,0924 ^a

^a teste exato de Fisher

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas.

Nas mulheres do grupo GA houve a reportar ainda agudizações de asma e rinite após a sua inclusão no estudo, tal como se descreve na tabela 8.

Tabela 8 – Agudizações de rinite alérgica e asma alérgica observadas em grávidas atópicas durante a gravidez e no puerpério.

AGUDIZAÇÕES	GA (n=24)
Rinite alérgica	
- 3.º trimestre de gravidez, n (%)	2 (8,3)
- Puerpério, n (%)	2 (8,3)
Exacerbação de asma alérgica	
- 3.º trimestre de gravidez, n (%)	4 (16,7)
- Puerpério, n (%)	1 (4,2)

GA – Grávidas atópicas.

Assim, quatro mulheres reportaram exacerbação de asma alérgica durante a gravidez, após a sua inclusão no estudo (entre as semanas 31 e 36 de gestação), com duas mulheres a apresentar sintomas nasais de rinite. No puerpério, documentaram-se apenas 1 mulher com exacerbação de asma alérgica, e 2 mulheres a reportarem queixas nasais. Nenhuma das situações implicou hospitalização ou recurso a serviço de urgência. Ainda relativamente ao grupo GA, apesar de todas as mulheres se encontrarem medicadas durante a gravidez, apenas 13 mulheres (54,2%) permaneceram com medicação após o parto (ICS e/ou LABA e antileucotrienos).

Tabela 9 – Caracterização demográfica e antropométrica dos subgrupos de mulheres grávidas atópicas com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

COMPARAÇÃO ENTRE SUBGRUPOS DE GA	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
Idade em anos, média (sd)			
	33,9 (2,6)	33,8 (3,0)	0,9226 ^a
IMC em kg/m ² , média (sd)			
	25,8 (2,1)	28,0 (3,6)	0,0702 ^a
Paridade, n (%)			
Nulíparas	5 (50,0)	7 (50,0)	1,0000 ^b
Múltíparas	5 (50,0)	7 (50,0)	
Pressão sistólica em mmHg, média (sd)			
	111 (10)	115 (14)	0,4561 ^a
Pressão diastólica em mmHg, média (sd)			
	66 (7)	67 (9)	0,7468 ^a
Nível de Escolaridade, n (%)			
Básico ou Secundário	0 (0,0)	2 (14,3)	0,4928 ^b
Superior	10 (100,0)	12 (85,7)	
Exposição passiva ao fumo do tabaco na gravidez, n (%)			
Sim	2 (20,0)	0 (0,0)	0,1630 ^b
Não	8 (80,0)	14 (100,0)	
Idade Gestacional (semanas) na avaliação T1, média (sd)			
	33,4 (1,2)	33,4 (1,1)	0,9524 ^a
Idade Gestacional (semanas) na avaliação T2, média (sd)			
	38,9 (0,7)	38,8 (1,3)	0,7887 ^a
Dias após parto na avaliação T3, média (sd)			
	52 (14)	46 (7)	0,2826 ^a
Tipo de parto, n (%)			
Vaginal	6 (60,0)	7 (50,0)	0,6968 ^b
Cesariana	4 (40,0)	7 (50,0)	
IMC na avaliação T3 em kg/m2, média (sd)			
	23,0 (2,2)	25,7 (4,0)	0,0477 ^a
Pressão sistólica na avaliação T3 em mmHg, média (sd)			
	113 (11)	112 (9)	0,7054 ^a
Pressão diastólica na avaliação T3 em mmHg, mediana (Q1-Q3)			
	68 (65-71)	69 (65-70)	0,8722 ^c
Contraceção na avaliação T3, n (%)			
Sim	7 (70,0)	11 (78,6)	0,6653 ^b
Não	3 (30,0)	3 (21,4)	
Medicação para condição alérgica na avaliação T3, n (%)			
Sim	5 (50%)	8 (57,1)	1,0000 ^b
Não	5 (50%)	6 (42,9)	
Complicações Alérgicas no 3.º trimestre da gravidez, n (%)			
Rinite alérgica	1 (10,0)	1 (7,1)	1,0000 ^b
Asma alérgica	1 (10,0)	3 (21,4)	0,6146 ^b
Complicações Alérgicas no puerpério, n (%)			
Rinite alérgica	0 (0,0)	1 (7,1)	1,0000 ^b
Asma alérgica	1 (10,0)	1 (7,1)	1,0000 ^b

Tabela 9 – Caracterização demográfica e antropométrica dos subgrupos de mulheres grávidas atópicas com e sem intercorrências alérgicas na descendência (continuação).

COMPARAÇÃO ENTRE SUBGRUPOS DE GA	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
Bebé: peso ao nascer em g, média (sd)			
	3279 (177)	3249 (411)	0,8122 ^a
Bebé: sexo, n (%)			
Masculino	8 (80,0)	4 (28,6)	0,0361 ^b
Feminino	2 (20,0)	10 (71,4)	
Mês do parto, n (%)			
Primavera/Verão	4 (40,0)	7 (50,0)	0,6968 ^b
Outono/Inverno	6 (60,0)	7 (50,0)	
Amamentação com leite materno, n (%)			
Sim	9 (90,0)	14 (100,0)	0,4167 ^b
Não	1 (10,0)	0 (0,0)	
História paterna de atopia, n (%)			
Sim	4 (40,0)	6 (42,9)	1,0000 ^b
Não	6 (60,0)	8 (57,1)	
História familiar de atopia, n (%)			
Sim	7 (70,0)	10 (71,4)	1,0000 ^b
Não	3 (30,0)	4 (28,6)	
Frequência de infantário, n (%)			
Sim	5 (50,0)	3 (21,4)	0,2038 ^b
Não	5 (50,0)	11 (78,6)	

^a teste t de Student não emparelhado, ^b teste exato de Fisher, ^c teste de Mann-Whitney U

GA – Grávidas atópicas, GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, sd – desvio-padrão, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil, T1 – avaliação temporal 1 (3.º trimestre de gravidez), T2 – avaliação temporal 2 (parto), T3 – avaliação temporal 3 (6 semanas após o parto).

Em relação às manifestações de risco para atopia na descendência (eczema atópico, bronquiolites de repetição, alergia alimentar), foram identificadas apenas 3 (7,0%) mulheres cujas crianças apresentaram manifestações de risco para atopia nos primeiros 6 meses de vida no grupo GS, e 10 (41,7%) mulheres no grupo GA. Nas crianças filhas de mulheres do grupo GA, a presença de eczema foi menos frequente que a sibilância (3/10 crianças com eczema, e 8/10 com sibilância), não tendo sido observada a ocorrência de alergia alimentar. Tendo em conta o reduzido número de observações para eczema, e ainda que 1 das crianças com eczema apresentou também sibilância, considerou-se apenas a divisão das mulheres do grupo GA em dois subgrupos: GA DA, mulheres com manifestações de risco para atopia (intercorrências alérgicas) na descendência, e GA SDA, mulheres sem manifestações de risco para atopia (intercorrências alérgicas) na descendência, tendo-se procedido à sua caracterização conforme a tabela 9.

Documentou-se a presença de eczema em 2 mulheres do grupo GA DA (20,0%) e em 2 mulheres do grupo GA SDA (14,3%), não se verificando diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a prevalência de eczema ($p=1,0000$; teste exato de Fisher). Não se documentou em nenhuma destas mulheres a existência de alergia alimentar ou alergia medicamentosa.

Na generalidade dos dados antropométricos e demográficos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois subgrupos de mulheres GA em estudo. Apenas o IMC após o puerpério se apresentava com valores mais elevados nas mulheres sem complicações de risco para atopia na descendência, uma tendência, aliás, já observada nos valores de IMC no terceiro trimestre da gravidez (ainda que não significativa). Não se verificaram diferenças com significado estatístico entre os grupos na idade materna, na paridade, nas características genéricas da gestação e parto, nem nas complicações alérgicas na gravidez e no puerpério, ou na utilização de terapêutica para a condição alérgica após o parto

Quanto às características da criança, os dois subgrupos de mulheres GA apenas mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao sexo. Verificou-se a existência de um maior número de crianças do sexo masculino no grupo de mulheres com manifestações de risco para atopia na descendência. Uma vez mais, as restantes características não apresentaram diferenças com significado estatístico entre os grupos (peso do bebé ao nascimento, mês de nascimento, história de atopia paterna ou familiar, amamentação com leite materno ou frequência de infantário até aos seis meses de vida).

4.2 O perfil imunológico da mulher não grávida com asma atópica

O primeiro objetivo deste trabalho foi a caracterização do perfil imune na mulher com asma atópica não grávida, para daí se poderem avaliar posteriores alterações decorrentes do impacto da gravidez ao nível da resposta imune. Assim, toda a avaliação foi iniciada com a comparação dos grupos de mulheres em idade fértil, não grávidas.

Populações leucocitárias

Na avaliação dos dois grupos de mulheres não grávidas, apenas se registaram diferenças estatisticamente significativas ao nível dos valores percentuais de eosinófilos em relação ao total de leucócitos. Assim, as mulheres do grupo NGA apresentaram valores mais elevados de eosinófilos que as mulheres do grupo NGS. Contudo, na abordagem dos valores absolutos, as não grávidas atópicas mostraram no geral valores mais elevados de leucócitos e das respetivas populações, com exceção dos monócitos, que não apresentaram diferenças entre os dois grupos de mulheres. A tabela 10 apresenta esta comparação.

Tabela 10 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

População Celular	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
Neutrófilos	55,94 (49,87-59,15)	56,04 (50,52-61,53)	0,8663
Monócitos	6,51 (5,98-7,17)	7,38 (5,77-9,55)	0,0590
Linfócitos	33,13 (30,28-36,73)	32,41 (29,10-37,41)	0,7153
Basófilos	0,84 (0,72-1,16)	0,85 (0,65-1,08)	0,7958
Eosinófilos	3,40 (2,13-4,47)	1,78 (1,3-2,61)	0,0009
Células/μL			
Neutrófilos	4703 (3640-5712)	4043 (2661-4694)	0,0228
Monócitos	574 (434-704)	524 (400-649)	0,3668
Linfócitos	2733 (2083-3384)	2081 (1783-2649)	0,0032
Basófilos	77 (54-97)	54 (43-83)	0,0141
Eosinófilos	238 (164-384)	118 (71-189)	<0,0001
Leucócitos totais	8353 (6840-10004)	7151 (5321-8363)	0,0024

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Subpopulações linfocitárias

Na generalidade, os valores absolutos das subpopulações de linfócitos demonstraram o mesmo comportamento que os valores dos linfócitos totais. Assim, as mulheres do grupo NGA apresentaram contagens significativamente mais elevadas de Linfócitos T, T CD4 e T CD8 e Linfócitos B. Não se observaram diferenças nas contagens de células NK, contudo, considerando que os valores percentuais das células NK se encontravam significativamente diminuídos no grupo NGA, esta diminuição poderá ter normalizado os valores absolutos. Nenhum outro valor percentual se mostrou alterado na comparação dos grupos de mulheres NGA vs NGS, como se pode ver na tabela 11.

Tabela 11 – Comparação de subpopulações linfocitárias entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação Linfocitária	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
Linfócitos T (%)	76 (72-81)	75 (71-78)	0,1550
Linfócitos T (Células/ μ L)	2099 (1582-2588)	1571 (1305-1990)	0,0027
Linfócitos B (%)	12 (11-15)	12 (10-14)	0,2657
Linfócitos B (Células/ μ L)	328 (249-437)	259 (176-305)	0,0007
Células NK (%)	9 (5-13)	11 (10-13)	0,0097
Células NK (Células/ μ L)	236 (170-328)	271 (178-327)	0,5724
Células NKT (%)	6 (4-9)	6 (4-9)	0,6302
Células NKT (Células/ μ L)	180 (127-234)	143 (94-176)	0,0509
Linfócitos T CD4 (%)	45 (42-49)	45 (42-50)	0,9328
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	1207 (981-1523)	987 (830-1199)	0,0103
Linfócitos T CD8 (%)	28 (23-32)	24 (22-29)	0,1514
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	781 (569-999)	558 (415-689)	0,0007
Razão CD4/CD8	1,67 (1,39-1,91)	1,87 (1,43-2,21)	0,3472

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação e ativação T

No que se refere ao perfil de maturação das células T encontramos diferenças nas populações de células de memória entre os grupos NGA e NGS, que parecem assumir um perfil semelhante em linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8. Desta forma, com um *pool* de células naïve aparentemente similar ao das mulheres do grupo NGS, as mulheres do grupo NGA têm menos células de memória central e mais células de memória efetoras terminais, quer dentro dos linfócitos T CD4, quer dentro dos linfócitos T CD8. Para as células de memória efetoras, a diferença cinge-se aos linfócitos T CD4, com as mulheres NGA a apresentarem igualmente valores mais elevados, como mostra a tabela 12. Em relação às contagens absolutas, as populações de células de memória efetoras e efetoras terminais assumiram valores significativamente mais elevados em mulheres NGA.

Tabela 12 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	42,32 (35,4-50,97)	40,54 (35,14-53,61)	0,8273
CD4 CM	37,82 (31,04-42,40)	43,86 (37,51-50,94)	0,0009
CD4 EM	16,81 (12,46-20,47)	10,35 (8,30-13,77)	0,0001
CD4 TEM	2,47 (0,64-6,43)	0,42 (0,18-0,64)	<0,0001
CD8 Naïve	48,84 (38,05-53,94)	51,45 (43,42-63,03)	0,3145
CD8 CM	11,14 (7,29-14,34)	17,74 (13,59-21,74)	<0,0001
CD8 EM	16,44 (10,83-23,08)	15,39 (9,7-20,05)	0,5534
CD8 TEM	22,91 (14,63-31,75)	13,22 (9,16-18,07)	0,0010
Células/μL			
CD4 Naïve	490 (368-724)	423 (288-617)	0,1815
CD4 CM	450 (320-587)	423 (329-542)	0,6602
CD4 EM	192 (140-285)	98 (71-150)	<0,0001
CD4 TEM	26 (7-105)	4 (2-7)	<0,0001
CD8 Naïve	362 (240-429)	282 (216-341)	0,0751
CD8 CM	89 (45-112)	90 (66-135)	0,2781
CD8 EM	124 (74-178)	89 (53-110)	0,0184
CD8 TEM	183(91-292)	66 (47-118)	0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Em relação aos eventos de ativação celular, encontrou-se apenas nas mulheres não grávidas atópicas menor percentagem de células a expressar CTLA-4 nos linfócitos T, T CD4 e T CD8. Exceto para o marcador CTLA-4, as contagens absolutas das subpopulações celulares que expressam marcadores de ativação nos linfócitos T apresentam valores mais elevados nas mulheres do grupo NGA (uma vez mais, associado ao aumento do total de linfócitos observado neste grupo), como mostra a tabela 13.

Tabela 13 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	11,43 (8,40-16,07)	9,99 (7,80-15,81)	0,7293
CD3 CD25 ⁺	21,22 (16,50-24,84)	18,47 (12,92-24,48)	0,3283
CD3 CTLA-4 ⁺	1,825 (1,05-3,10)	3,28 (1,59-9,17)	0,0060
CD4 HLA-DR ⁺	6,17 (5,14-10,19)	6,14 (5,50-8,16)	0,7434
CD4 CD25 ⁺	32,15 (25,58-37,30)	28,45 (21,20-36,55)	0,3205
CD4 CTLA-4 ⁺	1,57 (1,00-2,88)	3,01 (1,38-8,53)	0,0036
CD8 HLA-DR ⁺	18,68 (12,52-26,10)	18,31 (11,50-25,94)	0,8200
CD8 CD25 ⁺	3,42 (2,00-4,67)	2,54 (1,52-5,05)	0,7671
CD8 CTLA-4 ⁺	1,92 (1,17-3,43)	3,07 (1,79-10,09)	0,0050
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	241 (163-323)	174 (114-252)	0,0309
CD3 CD25 ⁺	419 (262-640)	309 (214-429)	0,0090
CD3 CTLA-4 ⁺	37 (19-75)	46 (26-121)	0,1063
CD4 HLA-DR ⁺	87 (67-112)	70 (48-88)	0,0080
CD4 CD25 ⁺	388 (250-558)	275 (200-390)	0,0101
CD4 CTLA-4 ⁺	22 (11-39)	28 (16-67)	0,0606
CD8 HLA-DR ⁺	132 (78-206)	95 (52-154)	0,0643
CD8 CD25 ⁺	22 (15-36)	14 (8-29)	0,0367
CD8 CTLA-4 ⁺	14 (7-34)	21 (10-48)	0,1035

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação B

Foi possível documentar alterações no compartimento B circulante das mulheres não grávidas com asma atópica, como se pode ver na tabela seguinte (tabela 14). Concretamente, a classificação ontogénica Bm1-5 evidenciou diferenças entre os grupos NGA e NGS em todas as subpopulações. Quanto aos valores absolutos, todas as subpopulações se apresentaram com valores significativamente mais elevados nas mulheres do grupo NGA, exceto as células de transição Bm2' e os plasmablastos Bm3+Bm4. Alias, na comparação de mulheres não grávidas atópicas e saudáveis, as contagens de plasmablastos encontravam-se inclusive diminuídas de forma estatisticamente significativa nas mulheres atópicas. Em termos percentuais, as mulheres do grupo NGA tinham igualmente valores mais elevados de células de memória Bm1 e Bm5, e valores mais baixos de células Bm2' e Bm3+Bm4. A percentagem de células Bm1 CD27⁺ (que serão células B de memória IgD⁺) encontrava-se também aumentada no grupo de mulheres NGA (% de células Bm1 CD27⁺, mediana (Q1-Q3): NGA - 9,3% (6,4-12,3), NGS – 6,2% (4,9-7,8); p=0,004, teste de Mann-Whitney U).

Tabela 14 – Comparação do perfil de maturação B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
Bm1	13,77 (9,96-20,26)	10,35 (8,41-13,82)	0,0126
Bm2	56,00 (48,78-63,23)	57,35 (51,04-64,16)	0,6738
Bm2'	3,55 (2,90-5,56)	6,22 (4,33-10,70)	0,0015
Bm3+Bm4	1,07 (0,72-1,57)	2,89 (1,59-3,81)	<0,0001
Bm5	8,83 (5,69-12,85)	6,00 (4,93-8,40)	0,0057
eBm5	11,27 (9,3-15,19)	10,47 (8,42-15,82)	0,6288
Células/μL			
Bm1	46 (34-83)	26 (16-34)	<0,0001
Bm2	189 (124-254)	149 (93-184)	0,0045
Bm2'	14 (9-17)	13 (10-27)	0,5218
Bm3+Bm4	4 (2-6)	7 (4-10)	0,0010
Bm5	30 (18-48)	16 (10-21)	<0,0001
eBm5	42 (28-57)	27 (16-39)	0,0019

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Curiosamente, como se pode ver na tabela 15, a avaliação das populações celulares B com a classificação clássica (expressão de IgD e CD27) não foi tão profícua na distinção de diferenças entre mulheres NGA e NGS.

Tabela 15 – Comparação do perfil de maturação B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
B naïve	55,32 (49,01-64,01)	58,81 (49,04-69,24)	0,4206
B memória	40,77 (33,77-47,08)	37,79 (28,32-46,20)	0,2796
B memória não <i>switched</i>	22,66 (17,15-26,56)	19,85 (15,85-24,02)	0,1920
B memória <i>switched</i>	16,71 (13,70-21,54)	16,65 (11,58-23,44)	0,6556
DN	2,31 (1,60-4,38)	3,87 (2,96-4,82)	0,0254
B de transição	2,98 (1,93-4,78)	3,74 (2,37-4,95)	0,3504
Plasmablastos	1,12 (0,67-1,47)	2,85 (1,46-4,09)	<0,0001
Células/μL			
B naïve	188(127-268)	149 (96-189)	0,0148
B memória	141 (92-206)	79 (63-109)	0,0005
B memória não <i>switched</i>	67 (52-114)	45 (33-68)	0,0003
B memória <i>switched</i>	64 (44-83)	37 (26-53)	0,0034
DN	10 (5-14)	9 (5-13)	0,7665
B de transição	11 (8-15)	9 (6-13)	0,1003
Plasmablastos	4 (2-5)	7 (4-11)	0,0007

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Na avaliação percentual, só a população de células B DN se mostrou significativamente diminuída em mulheres NGA. Pelo contrário, na avaliação das contagens celulares, todas as outras populações, exceto as células DN apresentaram valores mais elevados nas mulheres NGA, uma vez mais traduzindo o que se observou para os valores absolutos de linfócitos B totais. Olhando ainda a identificação de células B de transição e plasmablastos, foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas entre mulheres NGA e NGS, com as primeiras a mostrar menos plasmablastos em circulação (diferença com significado estatístico nos valores percentuais e nas contagens absolutas).

Células reguladoras

As subpopulações de células T $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$, $CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$ e $CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ estão entre as mais usuais formas de caracterizar e identificar as subpopulações de linfócitos Treg em circulação. Foram caracterizadas as células Treg recorrendo a estas três estratégias, que foram apresentando entre si resultados concordantes. Assim, comparando os grupos NGA e NGS, encontramos valores de células Treg aumentados nas mulheres atópicas (NGA), com diferenças estatisticamente significativas para valores percentuais e absolutos. A exceção foi a avaliação dos valores percentuais da subpopulação Treg $CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$, que ao contrário das restantes, não mostrou diferenças entre mulheres do grupo NGA e do grupo NGS, como mostra a tabela 16.

Tabela 16 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação Celular	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
Células T reguladoras			
$CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ (%)	7,73 (7,02-8,64)	7,79 (6,79-8,38)	0,8737
$CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ (Células/ μ L)	97 (75-127)	72 (59-94)	0,0027
$CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$ (%)	6,88 (5,45-7,62)	5,48 (4,61-6,30)	0,0021
$CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$ (Células/ μ L)	83 (69-102)	56 (38-69)	<0,0001
$CD4^{Dim}CD25^{Hi}$ (%)	6,56 (5,95-7,14)	5,98 (5,29-6,71)	0,0290
$CD4^{Dim}CD25^{Hi}$ (Células/ μ L)	83 (64-103)	56 (42-76)	0,0002
Expressão de Foxp3 em células T $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$	2,09 (1,88-2,31)	1,80 (1,72-1,97)	0,0002
Células B reguladoras			
$CD24^{Hi}CD27^{+}$ (%)	31,77 (25,44-38,81)	27,46 (17,59-32,21)	0,0715
$CD24^{Hi}CD27^{+}$ (Células/ μ L)	102 (68-165)	54 (44-84)	0,0001
$CD24^{Hi}CD38^{Hi}$ (%)	3,84 (2,36-5,10)	3,63 (2,17-4,65)	0,7387
$CD24^{Hi}CD38^{Hi}$ (Células/ μ L)	12 (8-15)	8 (6-14)	0,0211

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Na abordagem das células T reguladoras foi ainda avaliada a expressão de Foxp3 nas células Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi}. Os níveis de expressão de Foxp3, em unidades MFI, foram normalizados sob a forma de uma razão, tal como descrito em Material e Métodos. Na comparação de não grávidas atópicas e saudáveis, para além dos valores aumentados de células Treg, também a expressão de Foxp3 se encontrava aumentada nas mulheres do grupo NGA.

Só os valores absolutos das subpopulações B com funções reguladoras evidenciaram diferenças estatisticamente significativas na comparação de mulheres NGA vs NGS. Uma vez mais, com as mulheres do grupo NGA a apresentarem valores absolutos mais elevados que as mulheres do grupo NGS.

Citocinas e células produtoras de citocinas

De acordo com a tabela 17, verificou-se que não existiam diferenças significativas nas percentagens das diferentes populações de células produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres NGA e mulheres NGS. No entanto, quando se observaram os valores absolutos destas populações, sobretudo as células produtoras de IFN- γ encontravam-se aumentadas, com diferenças estatisticamente significativas, nas mulheres NGA. Dentro do compartimento T CD4, encontravam-se significativamente aumentadas no grupo NGA as células Th1 (IFN- γ ⁺ IL17⁻), as células produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺ IL17^{+/-}) e as células produtoras de IL17 (IL17⁺ IFN- γ ^{+/-}). No compartimento T CD8, as células Tc1 (IFN- γ ⁺ IL17⁻), as células Tc17 (IL17⁺ IFN- γ ⁻) e as células produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺ IL17^{+/-}) estavam igualmente com contagens absolutas mais elevadas nas mulheres NGA.

Tabela 17 – Comparação de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	38,18 (36,16-43,30)	36,89 (30,66-40,57)	0,0884
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	2,08 (1,66-2,78)	2,17 (1,74-2,46)	0,7293
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,98 (0,71-1,46)	0,93 (0,76-1,23)	0,6783
CD4 IFN- γ ⁺ total	38,99 (37,07-44,13)	38,1 (31,37-41,77)	0,0821
CD4 IL17 ⁺ total	3,15 (2,56-4,11)	3 (2,56-3,78)	0,7814
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	58,64 (49,04-69,24)	55,1 (49,39-67,63)	0,8443
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,62 (0,43-1,05)	0,61 (0,43-0,84)	0,7671
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,70 (0,34-1,08)	0,68 (0,53-1,20)	0,3602
CD8 IFN- γ ⁺ total	59,33 (49,51-69,81)	55,78 (50,96-68,96)	0,8590
CD8 IL17 ⁺ total	1,34 (0,75-1,93)	1,27 (1,03-2,05)	0,5639
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	535 (338-625)	357 (274-430)	0,0006
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	25 (19-38)	21 (17-28)	0,0604
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	13 (7-19)	9 (6-13)	0,0712
CD4 IFN- γ ⁺ total	552 (354-644)	369 (280-440)	0,0005
CD4 IL17 ⁺ total	41 (28-58)	28 (25-42)	0,0323
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	402 (289-671)	334 (213-394)	0,0151
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	5 (3-8)	3 (3-5)	0,0495
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	5 (2-9)	4 (3-8)	0,5772
CD8 IFN- γ ⁺ total	408 (292-674)	342 (219-415)	0,0139
CD8 IL17 ⁺ total	9 (6-17)	7 (6-13)	0,1038

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Como mostra a tabela 18, as células produtoras de IL10, dentro do compartimento T, evidenciaram valores absolutos e percentuais significativamente mais elevados nas mulheres do grupo NGA do que nas mulheres do grupo NGS. Na avaliação das células B, apenas se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos NGA e NGS nos valores absolutos das células produtoras de IL10.

Tabela 18 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,94 (0,73-1,19)	0,72 (0,51-1,08)	0,0241
CD4 IL10 ⁺	1,04 (0,84-1,55)	0,84 (0,66-1,20)	0,0335
CD8 IL10 ⁺	0,73 (0,48-0,99)	0,40 (0,21-0,80)	0,0088
CD19 IL10 ⁺	1,04 (0,77-1,50)	0,92 (0,60-1,30)	0,2781
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	19 (14-27)	12 (8-19)	0,0003
CD4 IL10 ⁺	14 (10-17)	8 (6-11)	0,0002
CD8 IL10 ⁺	5 (3-9)	2 (1-4)	0,0004
CD19 IL10 ⁺	4 (2-5)	2 (1-3)	0,0004

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Observou-se ainda, como mostra a tabela 19, uma diminuição estatisticamente significativa das concentrações séricas de IFN-γ nas mulheres do grupo NGA.

Tabela 19 – Comparação dos níveis séricos de IL4 e IFN-γ entre mulheres não grávidas atópicas e saudáveis.

Citocina	NGA (n=32)	NGS (n=35)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-194,0)*	0,3 (0,3-6,7)*	0,6472
IFN (pg/mL)	10,7 (2,8-36,2)	54,0 (12,1-77,6)	0,0019

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo; máximo).

NGA – Não grávidas atópicas, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

4.3 O perfil imunológico da mulher grávida do terceiro trimestre

Populações leucocitárias

Documentaram-se marcadas alterações na fórmula leucocitária materna, com exceção dos monócitos, em que se observam valores nas grávidas semelhantes aos valores de mulheres não grávidas. Para os valores percentuais, no terceiro trimestre de gravidez, as mulheres do grupo GS apresentaram um aumento marcado da população de neutrófilos, com diminuição de linfócitos, e também basófilos e eosinófilos. Um padrão semelhante foi documentado para os valores absolutos destas populações celulares (tabela 20).

Tabela 20 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

População Celular	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,73 (69,57-75,65)	56,04 (50,52-61,53)	<0,0001
Monócitos	7,35 (5,78-8,27)	7,38 (5,77-9,55)	0,3406
Linfócitos	18,75 (15,03-21,18)	32,41 (29,10-37,41)	<0,0001
Basófilos	0,39 (0,27-0,47)	0,85 (0,65-1,08)	<0,0001
Eosinófilos	1,04 (0,75-1,53)	1,78 (1,30-2,61)	0,0002
Células/μL			
Neutrófilos	7056 (5599-8377)	4043 (2661-4694)	<0,0001
Monócitos	663 (538-799)	524 (400-649)	0,0002
Linfócitos	1753 (1467-2168)	2081 (1783-2649)	0,0007
Basófilos	36 (27-48)	54 (43-83)	<0,0001
Eosinófilos	97 (73-146)	118 (71-189)	0,4051
Leucócitos Totais	9582 (7982-11390)	7151 (5321-8363)	<0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Subpopulações linfocitárias

Todas as subpopulações de linfócitos circulantes sofreram uma queda significativa no seu valor absoluto durante o terceiro trimestre de gravidez. Assim, encontraram-se nas mulheres do grupo GS valores diminuídos de linfócitos T, linfócitos B e células NK, quando comparadas com mulheres não grávidas saudáveis.

Na compartimentalização das subpopulações em termos percentuais, dentro dos linfócitos, verificou-se a existência, no terceiro trimestre de gravidez, de um aumento da população T, com diminuição das populações B e NK. Todas estas diferenças apresentaram significado estatístico (tabela 21).

As células NKT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nem para valores absolutos nem para valores relativos.

Para os linfócitos T, verificaram-se apenas alterações nas células T CD4, cujos valores percentuais se encontram significativamente aumentados nas mulheres do grupo GS. Contudo, este aumento não se traduz nos valores absolutos, que se encontram mesmo significativamente diminuídos nas mulheres GS em relação aos valores observados em mulheres do grupo NGS. Apesar de não se encontrar significado estatístico, as células T CD8 apresentam a mesma tendência, isto é, valores percentuais mais elevados, mas valores absolutos mais baixos nas mulheres do grupo GS, quando comparadas com mulheres do grupo NGS.

Tabela 21 – Comparação de subpopulações linfocitárias entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação Linfocitária	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
Linfócitos T (%)	80 (77-83)	75 (71-78)	< 0,0001
Linfócitos T (Células/ μ L)	1440 (1127-1740)	1571 (1305-1990)	0,0265
Linfócitos B (%)	10 (8-12)	12 (10-14)	0,0225
Linfócitos B (Células/ μ L)	173 (144-219)	259 (176-305)	< 0,0001
Células NK (%)	9 (6-11)	11 (10-13)	0,0004
Células NK (Células/ μ L)	149 (100-205)	271 (178-327)	< 0,0001
Células NKT (%)	7 (5-9)	6 (4-9)	0,8348
Células NKT (Células/ μ L)	108 (81-149)	143 (94-176)	0,1642
Linfócitos T CD4 (%)	48 (45-53)	45 (42-50)	0,0147
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	829 (713-1046)	987 (830-1199)	0,0433
Linfócitos T CD8 (%)	27 (24-32)	24 (22-29)	0,0885
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	493 (373-602)	558 (415-689)	0,1317
Razão CD4/CD8	1,78 (1,45-2,14)	1,87 (1,43-2,21)	0,9304

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação e ativação T

Na gravidez, as alterações dos perfis de maturação das células T só evidenciaram diferenças entre mulheres GS e NGS para a população de células T CD4 de memória central. Estas células estão, no terceiro trimestre da gravidez, diminuídas na circulação de mulheres GS. Esta diminuição verifica-se também nos respetivos valores absolutos da população T CD4 de memória central em mulheres GS. Na avaliação das contagens absolutas encontram-se ainda valores diminuídos de células T CD4 de memória efetoras, e de células T CD8 de memória central nas mulheres GS no terceiro trimestre da gravidez em relação a mulheres NGS. Os resultados encontram-se descritos na tabela 22.

Tabela 22 – Comparação do perfil de maturação T periférico entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	49,38 (39,67-56,57)	40,54 (35,14-53,61)	0,0547
CD4 CM	40,42 (34,19-44,63)	43,86 (37,51-50,94)	0,0287
CD4 EM	10,20 (7,28-12,26)	10,35 (8,30-13,77)	0,3109
CD4 TEM	0,50 (0,24-0,92)	0,42 (0,18-0,64)	0,5338
CD8 Naïve	58,04 (50,65-62,58)	51,45 (43,42-63,03)	0,1151
CD8 CM	16,33 (11,86-21,04)	17,74 (13,59-21,74)	0,3733
CD8 EM	12,94 (9,97-18,80)	15,39 (9,70-20,05)	0,3483
CD8 TEM	11,38 (6,84-15,57)	13,22 (9,16-18,07)	0,2333
Células/μL			
CD4 Naïve	413 (297-544)	423 (288-617)	0,9383
CD4 CM	322 (260-391)	423 (329-542)	0,0011
CD4 EM	83 (61-108)	98 (71-150)	0,0354
CD4 TEM	5 (2-8)	4 (2-7)	0,8899
CD8 Naïve	258 (171-371)	282 (216-341)	0,6404
CD8 CM	69 (56-107)	90 (66-135)	0,0150
CD8 EM	67 (49-93)	89 (53-110)	0,6404
CD8 TEM	53 (31-94)	66 (47-118)	0,1156

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Em termos de avaliação da ativação das células T, apenas se reportaram alterações na população de células T CD4 a expressar HLA-DR, com as mulheres GS a apresentarem valores significativamente mais baixos no terceiro trimestre da gravidez (percentagens e contagens absolutas). Estes resultados podem ser consultados na tabela 23.

Tabela 23 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	10,50 (7,68-14,95)	9,99 (7,80-15,81)	0,7322
CD3 CD25 ⁺	20,06 (17,02-28,37)	18,47 (12,92-24,48)	0,1217
CD3 CTLA-4 ⁺	2,68 (1,51-9,25)	3,28 (1,59-9,17)	0,7511
CD4 HLA-DR ⁺	5,33 (3,66-7,42)	6,14 (5,50-8,16)	0,0285
CD4 CD25 ⁺	31,35 (24,46-42,86)	28,45 (21,20-36,55)	0,1760
CD4 CTLA-4 ⁺	2,57 (1,36-8,25)	3,01 (1,38-8,53)	0,7549
CD8 HLA-DR ⁺	18,15 (12,80-24,85)	18,31 (11,50-25,94)	0,8358
CD8 CD25 ⁺	3,30 (2,13-4,86)	2,54 (1,52-5,05)	0,3157
CD8 CTLA-4 ⁺	2,85 (1,67-8,68)	3,07 (1,79-10,09)	0,4369
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	156 (105-184)	174 (114-252)	0,1192
CD3 CD25 ⁺	299 (241-331)	309 (214-429)	0,8868
CD3 CTLA-4 ⁺	39 (24-104)	46 (26-121)	0,3255
CD4 HLA-DR ⁺	49 (32-64)	70 (48-88)	0,0060
CD4 CD25 ⁺	281 (219-321)	275 (200-390)	0,8125
CD4 CTLA-4 ⁺	26 (10-64)	28 (16-67)	0,3773
CD8 HLA-DR ⁺	98 (54-123)	95 (52-154)	0,5706
CD8 CD25 ⁺	15 (12-20)	14 (8-29)	0,7357
CD8 CTLA-4 ⁺	15 (9-37)	21 (10-48)	0,2282

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação B

Foi na avaliação das células B que se identificaram mais diferenças na comparação das mulheres GS e NGS, como mostra a tabela 24. Assim, na classificação Bm1-5, as contagens absolutas de todas as subpopulações B avaliadas encontravam-se significativamente diminuídas nas mulheres GS, à luz da diminuição observada nos valores absolutos de linfócitos B totais. Na avaliação da distribuição das subpopulações, documentou-se diminuição das percentagens de células B de memória Bm1 e Bm5 nas mulheres do grupo GS, assim como das percentagens de células de transição Bm2' e de plasmablastos. A compensar esta diminuição, encontrou-se, em mulheres GS, um aumento percentual da população de células B naïve Bm2. Não se verificaram alterações em relação aos valores percentuais na população de células de memória eBm5.

Tabela 24 – Comparação do perfil de maturação B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
Bm1	7,99 (5,84-11,38)	10,35 (8,41-13,82)	0,0378
Bm2	67,68 (60,34-72,68)	57,35 (51,04-64,16)	< 0,0001
Bm2'	2,64 (1,63-4,39)	6,22 (4,33-10,70)	< 0,0001
Bm3+Bm4	1,54 (1,00-2,44)	2,89 (1,59-3,81)	0,0020
Bm5	4,69 (3,70-6,62)	6,00 (4,93-8,40)	0,0095
eBm5	10,65 (8,06-14,12)	10,47 (8,42-15,82)	0,8987
Células/μL			
Bm1	12 (9-22)	26 (16-34)	< 0,0001
Bm2	117 (87-159)	149 (93-184)	0,0500
Bm2'	4 (3-8)	13 (10-27)	< 0,0001
Bm3+Bm4	2 (2-4)	7 (4-10)	< 0,0001
Bm5	8 (6-12)	16 (10-21)	< 0,0001
eBm5	19 (13-26)	27 (16-39)	0,0092

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Do ponto de vista das contagens absolutas, com a classificação IgD/CD27, observaram-se nas mulheres GS valores mais baixos em todas as subpopulações, com exceção das células B de memória não *switched*. Nos valores percentuais das subpopulações B, no terceiro trimestre da gravidez, as mulheres GS apresentaram menos células B DN, menos células B de transição e menos plasmablastos do que as mulheres não grávidas saudáveis (tabela 25).

Tabela 25 – Comparação do perfil de maturação B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
B naïve	58,59 (50,13-67,93)	58,81 (49,04-69,24)	0,9761
B memória	39,56 (29,18-48,21)	37,79 (28,32-46,20)	0,6103
B memória não <i>switched</i>	23,03 (15,57-32,02)	19,85 (15,85-24,02)	0,1927
B memória <i>switched</i>	13,64 (11,46-18,24)	16,65 (11,58-23,44)	0,1199
DN	2,54 (1,66-3,63)	3,87 (2,96-4,82)	0,0012
B de transição	1,87 (1,05-2,63)	3,74 (2,37-4,95)	< 0,0001
Plasmablastos	1,39 (0,97-2,38)	2,85 (1,46-4,09)	0,0004
Células/μL			
B naïve	100 (70-149)	149 (96-189)	0,0016
B memória	64 (44-85)	79 (63-109)	0,0060
B memória não <i>switched</i>	35 (23-57)	45 (33-68)	0,0816
B memória <i>switched</i>	24 (18-31)	37 (26-53)	0,0001
DN	4 (3-6)	9 (5-13)	< 0,0001
B de transição	3 (1-5)	9 (6-13)	< 0,0001
Plasmablastos	2 (2-3)	7 (4-11)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Células reguladoras

Considerando os resultados obtidos com as diferentes populações de células reguladoras, é possível concluir que, em relação às células Treg, não se encontram diferenças estatisticamente significativas entre mulheres não grávidas e mulheres grávidas saudáveis no terceiro trimestre da gravidez. Ou seja, quer em termos percentuais, quer em termos absolutos, as populações de células Treg abordadas apresentaram valores concordantes entre si, sem diferenças entre os dois grupos. Contudo, foi possível observar que a expressão do fator de transcrição Foxp3 se encontrava significativamente diminuída na população de células Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi} nas mulheres do grupo GS no terceiro trimestre da gravidez, em relação às mulheres NGS.

Quanto às subpopulações de células B com funções reguladoras, encontramos uma diminuição dos valores absolutos nas mulheres GS, acompanhada de uma diminuição percentual na população de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}. Os resultados seguem na tabela 26.

Tabela 26 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação Celular	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (%)	7,76 (7,00-9,60)	7,79 (6,79-8,38)	0,4763
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (Células/ μ L)	69 (53-87)	72 (59-94)	0,2382
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,07 (3,96-7,40)	5,48 (4,61-6,30)	0,2921
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	50 (38-63)	56 (38-69)	0,2422
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,21 (5,61-6,92)	5,98 (5,29-6,71)	0,3109
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	51 (43-65)	56 (42-76)	0,3060
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,49 (1,40-1,59)	1,80 (1,72-1,97)	< 0,0001
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	26,92 (20,52-35,54)	27,46 (17,59-32,21)	0,6748
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	44 (30-71)	54 (44-84)	0,0371
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	1,42 (0,94-2,32)	3,63 (2,17-4,65)	< 0,0001
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	2 (2-4)	8 (6-14)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Citocinas e células produtoras de citocinas

Finalmente, analisando os resultados das diferentes populações celulares produtoras de citocinas na tabela 27, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre mulheres NGS e GS para os valores percentuais, quer no compartimento T CD4, quer no compartimento T CD8. No entanto, em valores absolutos, todas as subpopulações de células T CD4 caracterizadas apresentavam valores mais baixos nas mulheres do grupo GS, à semelhança do observado para as contagens absolutas de células T CD4 totais (a única exceção foi a população de células T CD4 polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺, que manteve valores absolutos semelhantes aos observados em mulheres NGS). Nos linfócitos T CD8 apenas se verificou diminuição dos valores absolutos das populações celulares produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/+}) nas mulheres do grupo GS.

Tabela 27 – Comparação de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	34,12 (27,74-41,53)	36,89 (30,66-40,57)	0,2979
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	1,95 (1,50-2,41)	2,17 (1,74-2,46)	0,1581
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,93 (0,71-1,08)	0,93 (0,76-1,23)	0,8086
CD4 IFN- γ ⁺ total	35,13 (28,53-42,57)	38,10 (31,37-41,77)	0,3086
CD4 IL17 ⁺ total	2,85 (2,33-3,55)	3,00 (2,56-3,78)	0,2785
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	52,71 (46,10-59,68)	55,10 (49,39-67,63)	0,1494
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,66 (0,42-0,99)	0,61 (0,43-0,84)	0,6226
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,68 (0,53-1,01)	0,68 (0,53-1,20)	0,8986
CD8 IFN- γ ⁺ total	53,32 (46,71-60,47)	55,78 (50,96-68,96)	0,1404
CD8 IL17 ⁺ total	1,33 (0,98-2,00)	1,27 (1,03-2,05)	0,9304
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	280 (231-359)	357 (274-430)	0,0102
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	17 (13-22)	21 (17-28)	0,0037
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	8 (6-10)	9 (6-13)	0,0772
CD4 IFN- γ ⁺ total	287 (235-367)	369 (280-440)	0,0101
CD4 IL17 ⁺ total	27 (20-32)	28 (25-42)	0,0114
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	242 (191-339)	334 (213-394)	0,0270
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	3 (2-5)	3 (3-5)	0,6644
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	4 (2-5)	4 (3-8)	0,2572
CD8 IFN- γ ⁺ total	257 (194-344)	342 (219-415)	0,0274
CD8 IL17 ⁺ total	7 (4-10)	7 (6-13)	0,4589

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Quanto à produção de IL10 pelas células T e B, após estimulação, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (NGS e GS), exceto no que se refere às contagens absolutas da população de células B produtoras de IL10, com valores mais baixos no grupo das mulheres grávidas saudáveis. A tabela 28 apresenta estes resultados.

Tabela 28 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,77 (0,54-1,01)	0,72 (0,51-1,08)	0,6876
CD4 IL10 ⁺	0,92 (0,65-1,16)	0,84 (0,66-1,20)	0,6620
CD8 IL10 ⁺	0,49 (0,25-0,80)	0,4 (0,21-0,80)	0,6261
CD19 IL10 ⁺	1,00 (0,63-1,53)	0,92 (0,60-1,30)	0,7663
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	10 (7-14)	12 (8-19)	0,4601
CD4 IL10 ⁺	8 (5-12)	8 (6-11)	0,3597
CD8 IL10 ⁺	2 (1-4)	2 (1-4)	0,7309
CD19 IL10 ⁺	2 (1-2)	2 (1-3)	0,0132

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Na avaliação das citocinas séricas, exposta na tabela 29, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas entre mulheres GS e NGS para IL4 e IFN-γ. No entanto, parece existir uma tendência para valores mais baixos de ambas as citocinas no soro de mulheres grávidas saudáveis.

Tabela 29 – Comparação dos níveis séricos de IL4 e IFN-γ entre mulheres grávidas e não grávidas saudáveis.

Citocina	GS (n=43)	NGS (n=35)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,3)*	0,3 (0,3-6,7)*	0,0860
IFN (pg/mL)	24,3 (8,1-44,2)	54,0 (12,1-77,6)	0,0895

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo; máximo).

GS – Grávidas saudáveis, NGS – Não grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

4.4 O perfil imunológico da mulher grávida do terceiro trimestre com asma atópica

Populações leucocitárias

Em relação às mulheres NGA, apresentou-se nas mulheres GA, no terceiro trimestre, um aumento das percentagens e das contagens absolutas de neutrófilos circulantes. Em paralelo, observou-se, a acompanhar a subida da população de neutrófilos, diminuição nas percentagens e valores absolutos de linfócitos, basófilos e eosinófilos. Em relação ao total de leucócitos no sangue periférico não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (tabela 30).

Tabela 30 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

População Celular	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,50 (69,59-72,89)	55,94 (49,87-59,15)	< 0,0001
Monócitos	6,89 (6,46-7,95)	6,51 (5,98-7,17)	0,1316
Linfócitos	19,07 (17,39-21,89)	33,13 (30,28-36,73)	< 0,0001
Basófilos	0,35 (0,28-0,46)	0,84 (0,72-1,16)	< 0,0001
Eosinófilos	1,61 (1,01-2,76)	3,40 (2,13-4,47)	0,0002
Células/μL			
Neutrófilos	6577 (5061-7939)	4703 (3640-5712)	< 0,0001
Monócitos	661 (542-715)	574 (434-704)	0,1153
Linfócitos	1685 (1523-2089)	2733 (2083-3384)	< 0,0001
Basófilos	32 (27-42)	77 (54-97)	< 0,0001
Eosinófilos	144 (100-255)	238 (164-384)	0,0010
Leucócitos Totais	9119 (7760-10825)	8353 (6840-10004)	0,1954

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

As mulheres dos grupos GA e GS apresentaram valores muito semelhantes na generalidade das populações analisadas de leucócitos circulantes (tabela 31). A única exceção foi observada nos eosinófilos, cujos valores percentuais se mostraram mais elevados em mulheres GA, apresentando uma tendência no mesmo sentido para os valores absolutos, que contudo não atingiu significância estatística.

Tabela 31 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

População Celular	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,50 (69,59-72,89)	71,73 (69,57-75,65)	0,3117
Monócitos	6,89 (6,46-7,95)	7,35 (5,78-8,27)	0,9405
Linfócitos	19,07 (17,39-21,89)	18,75 (15,03-21,18)	0,3856
Basófilos	0,35 (0,28-0,46)	0,39 (0,27-0,47)	0,7775
Eosinófilos	1,61 (1,01-2,76)	1,04 (0,75-1,53)	0,0231
Células/μL			
Neutrófilos	6577 (5061-7939)	7056 (5599-8377)	0,3872
Monócitos	661 (542-715)	663 (538-799)	0,4727
Linfócitos	1685 (1523-2089)	1753 (1467-2168)	0,9638
Basófilos	32 (27-42)	36 (27-48)	0,6468
Eosinófilos	144 (100-255)	97 (73-146)	0,0664
Leucócitos Totais	9119 (7760-10825)	9582 (7982-11390)	0,4074

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Subpopulações linfocitárias

Aprofundando a análise dentro da janela de linfócitos (tabela 32), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, entre mulheres dos grupos GA e NGA, nas contagens absolutas de todas as populações de linfócitos, que se encontram significativamente diminuídas nas mulheres GA, à imagem das contagens absolutas de linfócitos totais. Porém, encontrou-se ainda uma diminuição significativa nas percentagens de linfócitos B circulantes nas mulheres GA em comparação com as mulheres NGA. O compartimento T apresentou valores diferentes apenas nas contagens absolutas das populações de células T CD4 e T CD8 entre os dois grupos de mulheres com asma atópica. Uma vez mais, foram as mulheres GA que apresentaram valores significativamente mais baixos destas subpopulações de linfócitos, em relação às mulheres NGA.

Tabela 32 – Comparação de subpopulações linfocitárias entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação Linfocitária	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
Linfócitos T (%)	78 (74-82)	76 (72-81)	0,2813
Linfócitos T (Células/ μ L)	1340 (1127-1674)	2099 (1582-2588)	<0,0001
Linfócitos B (%)	10 (8-13)	12 (11-15)	0,0170
Linfócitos B (Células/ μ L)	188 (132-258)	328 (249-437)	<0,0001
Células NK (%)	10 (8-13)	9 (5-13)	0,2587
Células NK (Células/ μ L)	200 (126-228)	236 (170-328)	0,0432
Células NKT (%)	5 (4-8)	6 (4-9)	0,5153
Células NKT (Células/ μ L)	90 (55-161)	180 (127-234)	0,0041
Linfócitos T CD4 (%)	48 (44-52)	45 (42-49)	0,1033
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	833 (689-1095)	1207 (981-1523)	0,0002
Linfócitos T CD8 (%)	27 (24-31)	28 (23-32)	0,9836
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	462 (390-523)	781 (569-999)	< 0,0001
Razão CD4/CD8	1,73 (1,51-2,02)	1,67 (1,39-1,91)	0,4975

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Nos grupos de mulheres grávidas, GA e GS, as distribuições de linfócitos foram similares, não se verificando qualquer diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em estudo para linfócitos T, B, NK, NKT, T CD4 e T CD8 (tabela 33).

Tabela 33 – Comparação de subpopulações linfocitárias entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação Linfocitária	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
Linfócitos T (%)	78 (74-82)	80 (77-83)	0,1264
Linfócitos T (Células/ μ L)	1340 (1127-1674)	1440 (1127-1740)	0,6826
Linfócitos B (%)	10 (8-13)	10 (8-12)	0,6546
Linfócitos B (Células/ μ L)	188 (132-258)	173 (144-219)	0,4930
Células NK (%)	10 (8-13)	9 (6-11)	0,1335
Células NK (Células/ μ L)	200 (126-228)	149 (100-205)	0,1045
Células NKT (%)	5 (4-8)	7 (5-9)	0,1755
Células NKT (Células/ μ L)	90 (55-161)	108 (81-149)	0,3341
Linfócitos T CD4 (%)	48 (44-52)	48 (45-53)	0,6510
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	833 (689-1095)	829 (713-1046)	0,6993
Linfócitos T CD8 (%)	27 (24-31)	27 (24-32)	0,9559
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	462 (390-523)	493 (373-602)	0,9871
Razão CD4/CD8	1,73 (1,51-2,02)	1,78 (1,45-2,14)	0,8380

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação e ativação T

Foram sobretudo as subpopulações de células de memória que mostraram mais variações na comparação de mulheres com asma, grávidas e não grávidas, como se vê na tabela 34.

Dentro dos linfócitos T CD4, foram as percentagens das populações de células de memória efectoras (EM) e células de memória efectoras terminais (TEM) a mostrar-se diminuídas nas mulheres GA no terceiro trimestre. Os respetivos valores absolutos de células EM e TEM apresentaram-se igualmente mais baixos no grupo GA, assim como os valores absolutos das células de memória central. Com a mesma tendência, encontraram-se os valores absolutos das células naïve, contudo a diferença entre mulheres do grupo GA e mulheres do grupo NGA não foi estatisticamente significativa.

Para os linfócitos T CD8, as mulheres GA demonstraram diminuição das percentagens de células de memória efectoras terminais, mas as percentagens de células de memória central estavam aumentadas nestas mulheres. Para os valores absolutos destas subpopulações T CD8, verificaram-se, em mulheres GA, contagens inferiores em todos compartimentos, com exceção das células de memória central, onde não foram observadas diferenças com significado estatístico entre os grupos GA e NGA.

Tabela 34 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	46,51 (38,23-55,41)	42,32 (35,40-50,97)	0,2256
CD4 CM	37,20 (35,38-45,62)	37,82 (31,04-42,40)	0,1349
CD4 EM	11,03 (7,48-14,65)	16,81 (12,46-20,47)	0,0011
CD4 TEM	0,61 (0,40-1,58)	2,47 (0,64-6,43)	0,0047
CD8 Naïve	53,65 (48,36-62,85)	48,84 (38,05-53,94)	0,0533
CD8 CM	14,89 (9,49-21,00)	11,14 (7,29-14,34)	0,0083
CD8 EM	14,17 (9,53-17,77)	16,44 (10,83-23,08)	0,1630
CD8 TEM	13,08 (7,83-19,42)	22,91 (14,63-31,75)	0,0022
Células/ μ L			
CD4 Naïve	393 (288-551)	490 (368-724)	0,0652
CD4 CM	321 (271-414)	450 (320-587)	0,0104
CD4 EM	87 (61-133)	192 (140-285)	< 0,0001
CD4 TEM	5 (3-19)	26 (7-105)	0,0006
CD8 Naïve	268 (191-353)	362 (240-429)	0,0194
CD8 CM	79 (48-110)	89 (45-112)	0,7209
CD8 EM	68 (46-91)	124 (74-178)	0,0006
CD8 TEM	66 (29-108)	183 (91-292)	0,0002

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Para os perfis periféricos de linfócitos T (naïve e memória), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres dos grupos GA e GS (tabela 35).

Tabela 35 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	46,51 (38,23-55,41)	49,38 (39,67-56,57)	0,3961
CD4 CM	37,20 (35,38-45,62)	40,42 (34,19-44,63)	0,8711
CD4 EM	11,03 (7,48-14,65)	10,20 (7,28-12,26)	0,2321
CD4 TEM	0,61 (0,40-1,58)	0,50 (0,24-0,92)	0,0554
CD8 Naïve	53,65 (48,36-62,85)	58,04 (50,65-62,58)	0,4017
CD8 CM	14,89 (9,49-21,00)	16,33 (11,86-21,04)	0,7978
CD8 EM	14,17 (9,53-17,77)	12,94 (9,97-18,80)	0,9019
CD8 TEM	13,08 (7,83-19,42)	11,38 (6,84-15,57)	0,3524
Células/ μ L			
CD4 Naïve	393 (288-551)	413 (297-544)	0,6241
CD4 CM	321 (271-414)	322 (260-391)	0,8533
CD4 EM	87 (61-133)	83 (61-108)	0,3998
CD4 TEM	5 (3-19)	5 (2-8)	0,1428
CD8 Naïve	268 (191-353)	258 (171-371)	0,9250
CD8 CM	79 (48-110)	69 (56-107)	0,9250
CD8 EM	68 (46-91)	67 (49-93)	0,9405
CD8 TEM	66 (29-108)	53 (31-94)	0,4608

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Em relação à expressão de marcadores de ativação em termos percentuais, não se documentaram diferenças entre mulheres dos grupos GA e NGA, como se observa na tabela 36. Houve apenas algumas diferenças a apontar nas contagens absolutas das subpopulações de linfócitos T ativados, com valores significativamente mais baixos nas grávidas atópicas para as subpopulações de células T CD3 CD25⁺, CD4 HLA-DR⁺, CD4 CD25⁺ e CD8 CD25⁺.

Tabela 36 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	12,16 (9,10-19,03)	11,43 (8,40-16,07)	0,3112
CD3 CD25 ⁺	20,11 (18,24-24,67)	21,22 (16,50-24,84)	0,8502
CD3 CTLA-4 ⁺	1,95 (1,36-3,86)	1,83 (1,05-3,10)	0,2751
CD4 HLA-DR ⁺	5,84 (4,15-8,98)	6,17 (5,14-10,19)	0,3698
CD4 CD25 ⁺	32,30 (28,66-35,25)	32,15 (25,58-37,30)	0,7364
CD4 CTLA-4 ⁺	1,87 (1,20-3,90)	1,57 (1,00-2,88)	0,3335
CD8 HLA-DR ⁺	23,19 (17,84-35,63)	18,68 (12,52-26,10)	0,0867
CD8 CD25 ⁺	3,24 (2,44-3,99)	3,42 (2,00-4,67)	0,8340
CD8 CTLA-4 ⁺	2,43 (1,58-4,01)	1,92 (1,17-3,43)	0,0938
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	185 (114-265)	241 (163-323)	0,1041
CD3 CD25 ⁺	268 (212-394)	419 (262-640)	0,0072
CD3 CTLA-4 ⁺	28 (18-58)	37 (19-75)	0,4129
CD4 HLA-DR ⁺	47 (35-80)	87 (67-112)	0,0006
CD4 CD25 ⁺	254 (203-378)	388 (250-558)	0,0115
CD4 CTLA-4 ⁺	16 (11-31)	22 (11-39)	0,3897
CD8 HLA-DR ⁺	114 (66-164)	132 (78-206)	0,3132
CD8 CD25 ⁺	15 (11-23)	22 (15-36)	0,0258
CD8 CTLA-4 ⁺	11 (6-25)	14 (7-34)	0,6304

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Entre mulheres GA e GS, apenas se verificou diferença com significado estatístico no valor percentual da população de células T CD8 ativadas com expressão de HLA-DR. O aumento significativo desta população nas mulheres GA (células T CD8 HLA-DR⁺) terá promovido a tendência no mesmo sentido da população de células T ativadas com expressão de HLA-DR (células T totais CD3 HLA-DR⁺), que não alcançou ainda assim significado estatístico. Nenhuma população apresentou diferenças estatisticamente significativas nos valores absolutos na comparação entre os grupos GA e GS (tabela 37).

Tabela 37 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	12,16 (9,10-19,03)	10,50 (7,68-14,95)	0,0808
CD3 CD25 ⁺	20,11 (18,24-24,67)	20,06 (17,02-28,37)	0,8635
CD3 CTLA-4 ⁺	1,95 (1,36-3,86)	2,68 (1,51-9,25)	0,1699
CD4 HLA-DR ⁺	5,84 (4,15-8,98)	5,33 (3,66-7,42)	0,2587
CD4 CD25 ⁺	32,30 (28,66-35,25)	31,35 (24,46-42,86)	0,6753
CD4 CTLA-4 ⁺	1,87 (1,20-3,90)	2,57 (1,36-8,25)	0,1503
CD8 HLA-DR ⁺	23,19 (17,84-35,63)	18,15 (12,80-24,85)	0,0385
CD8 CD25 ⁺	3,24 (2,44-3,99)	3,30 (2,13-4,86)	0,7480
CD8 CTLA-4 ⁺	2,43 (1,58-4,01)	2,85 (1,67-8,68)	0,3507
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	185 (114-265)	156 (105-184)	0,1226
CD3 CD25 ⁺	268 (212-394)	299 (241-331)	0,7430
CD3 CTLA-4 ⁺	28 (18-58)	39 (24-104)	0,1274
CD4 HLA-DR ⁺	47 (35-80)	49 (32-64)	0,4567
CD4 CD25 ⁺	254 (203-378)	281 (219-321)	0,9948
CD4 CTLA-4 ⁺	16 (11-31)	26 (10-64)	0,1802
CD8 HLA-DR ⁺	114 (66-164)	98 (54-123)	0,1003
CD8 CD25 ⁺	15 (11-23)	15 (12-20)	0,8889
CD8 CTLA-4 ⁺	11 (6-25)	15 (9-37)	0,2752

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação B

Com a classificação Bm1-5, as mulheres GA revelaram ter, em percentagem, menos células B de memória (Bm1 e Bm5) e mais células B naïve (Bm2) e plasmablastos (Bm3+Bm4) do que as mulheres NGA. Com exceção dos plasmablastos, todas as populações B mostraram valores absolutos significativamente mais baixos nas mulheres do grupo GA, em relação ao observado nas mulheres do grupo NGA, como se pode ver na tabela 38.

Tabela 38 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
Bm1	11,05 (6,74-14,84)	13,77 (9,96-20,26)	0,0296
Bm2	64,08 (59,34-69,90)	56,00 (48,78-63,23)	0,0018
Bm2'	3,27 (2,04-6,29)	3,55 (2,90-5,56)	0,5188
Bm3+Bm4	1,41 (0,95-2,87)	1,07 (0,72-1,57)	0,0381
Bm5	5,67 (3,81-7,62)	8,83 (5,69-12,85)	0,0020
eBm5	9,64 (7,40-14,66)	11,27 (9,30-15,19)	0,0785
Células/μL			
Bm1	20 (8-34)	46 (34-83)	< 0,0001
Bm2	115 (92-173)	189 (124-254)	0,0003
Bm2'	6 (4-10)	14 (9-17)	< 0,0001
Bm3+Bm4	3 (2-5)	4 (2-6)	0,2022
Bm5	9 (5-18)	30 (18-48)	< 0,0001
eBm5	22 (12-25)	42 (28-57)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Apesar de não haver qualquer diferença estatisticamente significativa para as populações B identificadas com a classificação Bm1-5 na comparação entre os grupos GA e GS (em percentagem e valor absoluto), as mulheres atópicas parecem apresentar tendencialmente contagens absolutas superiores de células B de transição (Bm2'), como se observa na tabela 39.

Tabela 39 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
Bm1	11,05 (6,74-14,84)	7,99 (5,84-11,38)	0,1449
Bm2	64,08 (59,34-69,90)	67,68 (60,34-72,68)	0,2492
Bm2'	3,27 (2,04-6,29)	2,64 (1,63-4,39)	0,1659
Bm3+Bm4	1,41 (0,95-2,87)	1,54 (1,00-2,44)	0,9560
Bm5	5,67 (3,81-7,62)	4,69 (3,70-6,62)	0,2372
eBm5	9,64 (7,40-14,66)	10,65 (8,06-14,12)	0,3118
Células/μL			
Bm1	20 (8-34)	12 (9-22)	0,1929
Bm2	115 (92-173)	117 (87-159)	0,9044
Bm2'	6 (4-10)	4 (3-8)	0,0719
Bm3+Bm4	3 (2-5)	2 (2-4)	0,4933
Bm5	9 (5-18)	8 (6-12)	0,3982
eBm5	22 (12-25)	19 (13-26)	0,9353

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Com a classificação clássica IgD/CD27 das células B, apenas se encontraram, entre mulheres GA e NGA, diferenças nos valores percentuais das subpopulações de células B de memória *switched* e plasmablastos. Na linha do observado com a classificação Bm1-5, as células de memória *switched* apresentaram valores mais baixos nas mulheres GA, enquanto os plasmablastos se encontraram aumentados em relação às mulheres NGA. Todas as populações avaliadas neste ponto tinham diminuição dos valores absolutos nas mulheres GA em comparação com as mulheres NGA, exceto os plasmablastos, sem diferença estatisticamente significativa entre estes grupos, como apresentado na tabela 40.

Tabela 40 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
B naïve	59,14 (47,91-69,94)	55,32 (49,01-64,01)	0,3854
B memória	36,50 (27,69-47,33)	40,77 (33,77-47,08)	0,3192
B memória não <i>switched</i>	17,86 (16,33-30,27)	22,66 (17,15-26,56)	0,6249
B memória <i>switched</i>	13,70 (10,65-19,08)	16,71 (13,70-21,54)	0,0139
DN	2,85 (1,98-3,89)	2,31 (1,60-4,38)	0,6076
B de transição	3,20 (1,86-4,35)	2,98 (1,93-4,78)	0,6076
Plasmablastos	1,48 (1,00-2,71)	1,12 (0,67-1,47)	0,0203
Células/μL			
B naïve	103 (78-152)	188(127-268)	< 0,0001
B memória	60 (45-108)	141 (92-206)	< 0,0001
B memória não <i>switched</i>	38 (24-62)	67 (52-114)	0,0002
B memória <i>switched</i>	26 (15-35)	64 (44-83)	< 0,0001
DN	6 (2-7)	10 (5-14)	0,0027
B de transição	6 (3-9)	11 (8-15)	0,0002
Plasmablastos	3 (2-6)	4 (2-5)	0,3389

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Apenas uma população se destacou nas mulheres do grupo GA, quando comparadas com as mulheres do grupo GS no terceiro trimestre da gravidez: a população de células B de transição. Como disposto na tabela 41, estas células apresentaram-se mais elevadas nas grávidas atópicas, quer em valor percentual quer em valor absoluto (p<0,004).

Tabela 41 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
B naíve	59,14 (47,91-69,94)	58,59 (50,13-67,93)	0,8079
B memória	36,50 (27,69-47,33)	39,56 (29,18-48,21)	0,6448
B memória não <i>switched</i>	17,86 (16,33-30,27)	23,03 (15,57-32,02)	0,6542
B memória <i>switched</i>	13,70 (10,65-19,08)	13,64 (11,46-18,24)	0,7285
DN	2,85 (1,98-3,89)	2,54 (1,66-3,63)	0,3783
B de transição	3,20 (1,86-4,35)	1,87 (1,05-2,63)	0,0017
Plasmablastos	1,48 (1,00-2,71)	1,39 (0,97-2,38)	0,5393
Células/μL			
B naíve	103 (78-152)	100 (70-149)	0,6239
B memória	60 (45-108)	64 (44-85)	0,7727
B memória não <i>switched</i>	38 (24-62)	35 (23-57)	0,8736
B memória <i>switched</i>	26 (15-35)	24 (18-31)	0,7429
DN	6 (2-7)	4 (3-6)	0,2582
B de transição	6 (3-9)	3 (1-5)	0,0036
Plasmablastos	3 (2-6)	2 (2-3)	0,2710

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Células reguladoras

As células T reguladoras evidenciaram apenas diferenças nos valores absolutos entre os grupos GA e NGA. Desta forma, identificaram-se nas mulheres do grupo GA menos células das três subpopulações de células Treg estudadas, como se observou anteriormente para as contagens absolutas da respetiva população mãe de células T CD4. Entre os grupos GA e NGA, não houve diferenças em nenhuma das subpopulações celulares para os respetivos valores percentuais. Contudo, ao nível da expressão de Foxp3 na população de células Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi}, e de modo semelhante ao observado na comparação dos grupos GS e NGS, também aqui as mulheres grávidas (GA) apresentaram níveis de expressão mais baixos do fator de transcrição Foxp3, em relação às mulheres do grupo NGA (tabela 42).

Quando se compararam as populações B com funções de regulação entre os grupos GA e NGA, verificou-se que para além da diminuição dos valores absolutos de ambas as subpopulações B ensaiadas, nas mulheres grávidas também as percentagens de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} se encontravam significativamente diminuídas em comparação com mulheres do grupo NGA.

Tabela 42 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação Celular	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (%)	8,22 (6,79-8,95)	7,73 (7,02-8,64)	0,4719
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (Células/ μ L)	63 (51-84)	97 (75-127)	0,0005
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,14 (5,65-7,19)	6,88 (5,45-7,62)	0,3809
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	52 (42-64)	83 (69-102)	< 0,0001
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,41 (5,28-7,06)	6,56 (5,95-7,14)	0,5134
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	53 (40-66)	83 (64-103)	< 0,0001
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,64 (1,51-1,77)	2,09 (1,88-2,31)	< 0,0001
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	25,47 (19,05-35,80)	31,77 (25,44-38,81)	0,1024
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	45 (28-75)	102 (68-165)	0,0002
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	1,87 (0,81-3,78)	3,84 (2,36-5,10)	0,0012
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	3 (2-6)	12 (8-15)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

As mulheres do grupo GA apresentaram níveis de expressão de Foxp3 significativamente mais elevados que as mulheres do grupo GS. Em nenhuma população reguladora T ou B se encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar de se observar uma tendência para valores absolutos mais elevados na população de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} em mulheres do grupo GA (tabela 43).

Tabela 43 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação Celular	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (%)	8,22 (6,79-8,95)	7,76 (7,00-9,60)	0,8178
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (Células/ μ L)	63 (51-84)	69 (53-87)	0,7578
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,14 (5,65-7,19)	6,07 (3,96-7,40)	0,4549
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	52 (42-64)	50 (38-63)	0,4070
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,41 (5,28-7,06)	6,21 (5,61-6,92)	0,7627
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	53 (40-66)	51 (43-65)	0,9767
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,64 (1,51-1,77)	1,49 (1,40-1,59)	0,0073
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	25,47 (19,05-35,80)	2 (20,52-35,54)	0,7878
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	45 (28-75)	44 (30-71)	0,7902
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	1,87 (0,81-3,78)	1,42 (0,94-2,32)	0,2270
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	3 (2-6)	2 (2-4)	0,0725

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Citocinas e células produtoras de citocinas

Na comparação dos grupos GA e NGA para a produção de citocinas pró-inflamatórias, verificaram-se comportamentos distintos entre os compartimentos T CD4 e T CD8, de acordo com o exposto na tabela 44. Desta forma, nas células T CD4, observou-se uma diminuição da percentagem de células produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/+}) em grávidas atópicas. Todas as subpopulações do compartimento T CD4 apresentaram valores absolutos significativamente diminuídos em mulheres do grupo GA, em comparação com mulheres do grupo NGA. Só as células polifuncionais não seguiram este perfil, mantendo-se em níveis semelhantes nas mulheres dos grupos GA e NGA.

No compartimento T CD8, as alterações aconteceram sobretudo com as células produtoras de IL17. Assim, as mulheres do grupo GA evidenciaram valores percentuais superiores de células T CD8 produtoras de IL17 (IL17⁺ IFN^{+/+}) e também de células T CD8 polifuncionais (IFN- γ ⁺ IL17⁺). Por outro lado, quando se avaliaram os valores absolutos, as populações de células T CD8 produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/+}) foram as únicas com diferenças estatisticamente significativas, encontrando-se diminuídas em mulheres do grupo GA, quando comparadas com mulheres do grupo NGA.

Tabela 44 – Comparação de subpopulações de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	31,71 (22,30-44,33)	38,18 (36,16-43,30)	0,0181
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	2,13 (1,86-2,60)	2,08 (1,66-2,78)	0,7025
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	1,15 (0,90-1,58)	0,98 (0,71-1,46)	0,2436
CD4 IFN- γ ⁺ total	33,26 (23,29-45,52)	38,99 (37,07-44,13)	0,0240
CD4 IL17 ⁺ total	3,48 (2,85-4,01)	3,15 (2,56-4,11)	0,4668
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	51,18 (41,83-67,39)	58,64 (49,04-69,24)	0,0972
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,90 (0,59-1,06)	0,62 (0,43-1,05)	0,0906
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	1,01 (0,76-1,44)	0,70 (0,34-1,08)	0,0123
CD8 IFN- γ ⁺ total	52,61 (43,28-68,08)	59,33 (49,51-69,81)	0,1183
CD8 IL17 ⁺ total	1,83 (1,52-2,60)	1,34 (0,75-1,93)	0,0172
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	289 (200-356)	535 (338-625)	< 0,0001
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	18 (15-22)	25 (19-38)	0,0023
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	10 (7-14)	13 (7-19)	0,1764
CD4 IFN- γ ⁺ total	296 (209-366)	552 (354-644)	< 0,0001
CD4 IL17 ⁺ total	27 (23-35)	41 (28-58)	0,0082
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	238 (203-344)	402 (289-671)	0,0002
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	4 (3-6)	5 (3-8)	0,3610
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	5 (3-8)	5 (2-9)	0,9046
CD8 IFN- γ ⁺ total	242 (208-348)	408 (292-674)	0,0002
CD8 IL17 ⁺ total	9 (6-14)	9 (6-17)	0,6241

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Comparando os grupos GA e GS para a produção de IFN- γ e IL17, verificaram-se perfis semelhantes nas células T CD4 e nas células T CD8, isto é, as respectivas percentagens de células polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺ e de células produtoras de IL17 (IL17⁺IFN- γ ^{+/−}) estavam significativamente mais elevadas em mulheres do grupo GA do que em mulheres do grupo GS. No entanto, em termos absolutos, só se registaram diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos GA e GS, nas células T CD4 polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺ (apenas uma tendência não significativa nas células T CD8 polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺) e nas células T CD8 produtoras de IL17. Em ambos os casos, as mulheres GA mostraram valores mais elevados do que as mulheres GS (tabela 45).

Tabela 45 – Comparação de subpopulações de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	31,71 (22,30-44,33)	34,12 (27,74-41,53)	0,5742
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	2,13 (1,86-2,60)	1,95 (1,50-2,41)	0,1088
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	1,15 (0,90-1,58)	0,93 (0,71-1,08)	0,0114
CD4 IFN- γ ⁺ total	33,26 (23,29-45,52)	35,13 (28,53-42,57)	0,6542
CD4 IL17 ⁺ total	3,48 (2,85-4,01)	2,85 (2,33-3,55)	0,0385
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	51,18 (41,83-67,39)	52,71 (46,10-59,68)	0,8102
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,90 (0,59-1,06)	0,66 (0,42-0,99)	0,0825
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	1,01 (0,76-1,44)	0,68 (0,53-1,01)	0,0275
CD8 IFN- γ ⁺ total	52,61 (43,28-68,08)	53,32 (46,71-60,47)	0,8633
CD8 IL17 ⁺ total	1,83 (1,52-2,60)	1,33 (0,98-2,00)	0,0197
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	289 (200-356)	280 (231-359)	0,6945
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	18 (15-22)	17 (13-22)	0,3701
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	10 (7-14)	8 (6-10)	0,0455
CD4 IFN- γ ⁺ total	296 (209-366)	287 (235-367)	0,7727
CD4 IL17 ⁺ total	27 (23-35)	27 (20-32)	0,1953
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	238 (203-344)	242 (191-339)	0,8178
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	4 (3-6)	3 (2-5)	0,0959
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	5 (3-8)	4 (2-5)	0,0608
CD8 IFN- γ ⁺ total	242 (208-348)	257 (194-344)	0,7628
CD8 IL17 ⁺ total	9 (6-14)	7 (4-10)	0,0402

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

A percentagem de células T e B a produzir IL10 foi semelhante nos grupos GA e NGA. Registou-se apenas a diminuição significativa dos valores absolutos destas subpopulações celulares em mulheres do grupo GA, em relação às mulheres do grupo NGA como se apresenta na tabela 46.

Tabela 46 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Subpopulação de Linfócitos	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,83 (0,71-1,40)	0,94 (0,73-1,19)	0,6484
CD4 IL10 ⁺	1,00 (0,85-1,61)	1,04 (0,84-1,55)	0,7581
CD8 IL10 ⁺	0,66 (0,36-1,05)	0,73 (0,48-0,99)	0,5241
CD19 IL10 ⁺	1,26 (0,97-1,64)	1,04 (0,77-1,50)	0,0689
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	14 (9-16)	19 (14-27)	0,0015
CD4 IL10 ⁺	10 (7-12)	14 (10-17)	0,0017
CD8 IL10 ⁺	3 (2-5)	5 (3-9)	0,0142
CD19 IL10 ⁺	2 (1-3)	4 (2-5)	0,0072

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Apesar de não haver diferenças a reportar no que se refere à produção de IL10 pelas células T em mulheres dos grupos GA e GS no terceiro trimestre de gravidez, foram registadas diferenças estatisticamente significativas nas células B. Assim, observaram-se mais células B produtoras de IL10 após estimulação em mulheres GA, considerando valores percentuais (em relação às células B totais) e valores absolutos (tabela 47).

Tabela 47 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Subpopulação de Linfócitos	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
%			
CD3 IL10⁺	0,83 (0,71-1,40)	0,77 (0,54-1,01)	0,2073
CD4 IL10⁺	1,00 (0,85-1,61)	0,92 (0,65-1,16)	0,3180
CD8 IL10⁺	0,66 (0,36-1,05)	0,49 (0,25-0,80)	0,1740
CD19 IL10⁺	1,26 (0,97-1,64)	1,00 (0,63-1,53)	0,0219
Células/μL			
CD3 IL10⁺	14 (9-16)	10 (7-14)	0,1283
CD4 IL10⁺	10 (7-12)	8 (5-12)	0,2255
CD8 IL10⁺	3 (2-5)	2 (1-4)	0,1561
CD19 IL10⁺	2 (1-3)	2 (1-2)	0,0102

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Como se verifica na tabela 48, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações séricas de IL4 e IFN-γ entre mulheres dos GA e NGA.

Tabela 48 – Comparação dos níveis séricos de IL4 e IFN-γ entre mulheres atópicas grávidas e não grávidas.

Citocina	GA (n=24)	NGA (n=32)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,8)*	0,3 (0,3-194,0)*	0,2884
IFN (pg/mL)	12,3 (2,8-23,9)	10,7 (2,8-36,2)	0,6271

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo- máximo).

GA – Grávidas atópicas, NGA – Não grávidas atópicas, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Na comparação de mulheres GA e GS, como mostra a tabela 49, apesar de os valores de IL4 séricos se encontrarem sem variação significativa entre os dois grupos, verificou-se que as mulheres GA, no terceiro trimestre de gravidez, exibiam valores séricos de IFN-γ mais baixos do que as mulheres GS.

Tabela 49 – Comparação dos níveis séricos de IL4 e IFN-γ entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis.

Citocina	GA (n=24)	GS (n=43)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,8)*	0,3 (0,3-0,3)*	0,3582
IFN (pg/mL)	12,3 (2,8-23,9)	24,3 (8,1-44,2)	0,0378

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo- máximo).

GA – Grávidas atópicas, GS – Grávidas saudáveis, Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

4.5 Do terceiro trimestre de gravidez ao fim do puerpério

GA e GS no parto

Do ponto de vista da comparação das mulheres dos grupos GA e GS, a primeira avaliação T1 mostrou que, no terceiro trimestre da gravidez, apenas se podiam encontrar pequenas diferenças entre as mulheres dos dois grupos, tal como se reportou para os valores séricos de IFN- γ . Curiosamente, as diferenças entre os dois grupos de mulheres diluíram-se substancialmente no parto, onde apenas se verificou diferença estatisticamente significativa exactamente nos níveis séricos de IFN- γ . Como se mostra na figura 23, as mulheres GA voltaram a mostrar valores de IFN- γ diminuídos, em relação a mulheres GS ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney U).

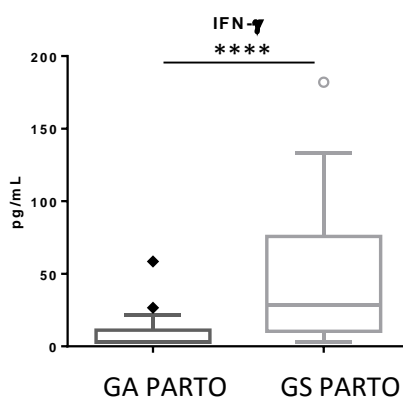


Figura 23 – Comparação dos níveis séricos de IFN- γ entre mulheres grávidas atópicas e saudáveis. ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney), no parto.

GA PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 2 (T2 - parto), GS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 2 (T2 - parto).

Populações leucocitárias do terceiro trimestre ao fim do puerpério

Para as mulheres do grupo GS, observou-se uma diminuição significativa dos valores absolutos de leucócitos totais depois da gravidez. A acompanhar esta descida, encontrou-se, no grupo GS, a população de neutrófilos com valores mais baixos (em percentagem e valor absoluto) depois do puerpério. Consequentemente, as restantes populações de leucócitos fizeram um percurso inverso, com recuperação no período pós-natal. Estes perfis de evolução ao longo do tempo foram similares para os valores absolutos e percentuais. Contudo, destacam-se deste perfil os monócitos. Por um lado, não apresentaram diferenças significativas nos valores percentuais entre as duas avaliações T1 e T3, e, em relação aos valores absolutos, seguiram os neutrófilos, encontrando-se contagens mais baixas de monócitos após o puerpério (tabela 50).

Na monitorização das mulheres do grupo GA desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério, o comportamento das populações de leucócitos foi em tudo semelhante ao perfil encontrado em mulheres saudáveis (tabela 51).

Tabela 50 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

População Celular	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,73 (69,57-75,65)	55,43 (51,96-59,89)	< 0,0001
Monócitos	7,35 (5,78-8,27)	6,77 (5,58-8,13)	0,5557
Linfócitos	18,75 (15,03-21,18)	32,71 (30,29-36,66)	< 0,0001
Basófilos	0,39 (0,27-0,47)	0,86 (0,60-1,02)	< 0,0001
Eosinófilos	1,04 (0,75-1,53)	2,56 (1,53-3,33)	< 0,0001
Células/μL			
Neutrofilos	7056 (5599-8377)	3624 (3068-4205)	< 0,0001
Monocitos	663 (538-799)	439 (366-540)	< 0,0001
Linfocitos	1753 (1467-2168)	2158 (1813-2433)	< 0,0001
Basofilos	36 (27-48)	55 (40-68)	< 0,0001
Eosinófilos	97 (73-146)	178 (101-238)	< 0,0001
Leucócitos totais	9582 (7982-11390)	6383 (5771-7871)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 51 – Comparação das populações leucocitárias entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

População Celular	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,50 (69,59-72,89)	54,72 (51,78-58,71)	< 0,0001
Monócitos	6,89 (6,46-7,95)	6,42 (5,77-7,54)	0,0555
Linfócitos	19,07 (17,39-21,89)	35,13 (29,82-38,14)	< 0,0001
Basófilos	0,35 (0,28-0,46)	0,74 (0,66-0,85)	< 0,0001
Eosinófilos	1,61 (1,01-2,76)	3,27 (2,00-4,79)	< 0,0001
Células/μL			
Neutrofilos	6577 (5061-7939)	3677 (3098-4889)	< 0,0001
Monocitos	661 (542-715)	460 (374-552)	< 0,0001
Linfocitos	1685 (1523-2089)	2179 (1911-2564)	0,0001
Basofilos	32 (27-42)	56 (42-74)	0,0001
Eosinófilos	144 (100-255)	254 (134-316)	0,0042
Leucócitos totais	9119 (7760-10825)	6576 (5756-8806)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Subpopulações linfocitárias do terceiro trimestre ao fim do puerpério

Na monitorização das mulheres GS, todas as populações mostraram valores absolutos mais altos após a gravidez (tabela 52). Em relação às células B, após o puerpério, a sua percentagem era ainda mais baixa, enquanto as células NK e NKT se encontravam com valores ligeiramente mais elevados na avaliação final. Para as subpopulações de linfócitos T, há a reportar apenas o aumento das principais populações celulares após o puerpério, no que se refere aos valores absolutos. Apesar de não existir diferença estatisticamente significativa nas percentagens de células T CD4 e T CD8, a razão CD4/CD8 encontrava-se ligeiramente diminuída após o puerpério.

Foi também semelhante a evolução das subpopulações linfocitárias entre o terceiro trimestre da gravidez e o período pós-parto avaliado em mulheres do grupo GA (tabela 53). A destacar apenas as células B, que não revelaram diferenças entre terceiro trimestre e pós-parto para valores percentuais e absolutos, e ainda a percentagem de células NK, que apesar de seguirem a tendência observada no grupo GS, não apresentou diferença estatisticamente significativa no grupo GA. Nas mulheres GA, a evolução das subpopulações T foi semelhante às mulheres GS. Porém, a razão CD4/CD8 manteve-se sem diferença estatisticamente significativa entre o terceiro trimestre da gravidez e o fim do puerpério (ao contrário do observado no grupo GS).

Tabela 52 – Comparação das subpopulações linfocitárias entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Linfocitária	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
Linfócitos T (%)	80 (77-83)	80 (76-83)	0,6133
Linfócitos T (Células/ μ L)	1440 (1127-1740)	1680 (1443-2008)	< 0,0001
Linfócitos B (%)	10 (8-12)	9 (7-11)	0,0004
Linfócitos B (Células/ μ L)	173 (144-219)	198 (140-266)	0,0082
Células NK (%)	9 (6-11)	10 (7-15)	0,0095
Células NK (Células/ μ L)	149 (100-205)	211 (166-268)	< 0,0001
Células NKT (%)	7 (5-9)	7 (6-9)	0,0025
Células NKT (Células/ μ L)	108 (81-149)	147 (116-208)	< 0,0001
Linfócitos T CD4 (%)	48 (45-53)	48 (45-51)	0,2514
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	829 (713-1046)	1036 (840-1211)	< 0,0001
Linfócitos T CD8 (%)	27 (24-32)	28 (24-33)	0,0711
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	493 (373-602)	606 (475-766)	< 0,0001
Razão CD4/CD8	1,78 (1,45-2,14)	1,75 (1,35-2,13)	0,0450

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 53 – Comparação das subpopulações linfocitárias entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subopulação Linfocitária	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
Linfócitos T (%)	78 (74-82)	77 (74-81)	0,9263
Linfócitos T (Células/ μ L)	1340 (1127-1674)	1746 (1465-2055)	< 0,0001
Linfócitos B (%)	10 (8-13)	10 (8-12)	0,1110
Linfócitos B (Células/ μ L)	188 (132-258)	222 (171-284)	0,0604
Células NK (%)	10 (8-13)	11 (8-14)	0,2811
Células NK (Células/ μ L)	200 (126-228)	241 (181-316)	< 0,0001
Células NKT (%)	5 (4-8)	6 (4-9)	0,0358
Células NKT (Células/ μ L)	90 (55-161)	141 (86-211)	0,0002
Linfócitos T CD4 (%)	48 (44-52)	48 (44-51)	0,7545
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	833 (689-1095)	1063 (903-1431)	< 0,0001
Linfócitos T CD8 (%)	27 (24-31)	28 (23-31)	0,765
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	462 (390-523)	618 (509-757)	0,0003
Razão CD4/CD8	1,73 (1,51-2,02)	1,75 (1,42-2,02)	0,6995

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação e ativação T do terceiro trimestre ao fim do puerpério

No grupo de mulheres GS, todas as subpopulações de células T maduras em circulação se encontravam com valores absolutos aumentados após o puerpério (tabela 54). Nos valores percentuais, encontrou-se na população de linfócitos T CD4 um perfil semelhante ao dos linfócitos T CD8 (diferenças mais marcadas nestes últimos). Assim, após o puerpério, documentaram-se percentagens inferiores de células T naïve, e percentagens mais elevadas de células T de memória efectoras e células T de memória efectoras terminais.

As variações evidenciadas no grupo GA entre o terceiro trimestre de gravidez e o fim do puerpério foram semelhantes ao observado no grupo GS, como se vê na tabela 55. Reportaram-se ainda assim algumas diferenças. No grupo GA, a generalidade das subpopulações evidenciou um aumento dos valores absolutos após o puerpério, exceto as células T CD8 de memória central, sem diferenças entre a avaliação T1 (gravidez) e a avaliação T3 (pós-parto). Quanto aos valores percentuais, as variações dentro dos linfócitos T CD4 foram semelhantes entre os dois grupos (GA e GS), sobretudo para as células de memória (CM, EM e TEM). No entanto, as células T CD4 naïve não variaram significativamente entre as duas avaliações T1 e T3 nas mulheres do grupo GA (ao contrário do observado no grupo GS). Em relação aos linfócitos T CD8, a única diferença nas comparações intragrupo em mulheres GA e GS (da gravidez ao fim do puerpério) aconteceu na população de células de memória central, que apenas nas mulheres GA diminuíram significativamente no fim do puerpério em relação ao terceiro trimestre da gravidez.

Tabela 54 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Linfocitária	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	49,38 (39,67-56,57)	48,06 (41,83-56,31)	0,0263
CD4 CM	40,42 (34,19-44,63)	40,33 (34,23-43,07)	0,6281
CD4 EM	10,20 (7,28-12,26)	10,90 (9,09-14,15)	< 0,0001
CD4 TEM	0,50 (0,24-0,92)	0,60 (0,26-1,22)	< 0,0001
CD8 Naïve	58,04 (50,65-62,58)	49,30 (41,81-58,79)	<0,0001
CD8 CM	16,33 (11,86-21,04)	15,27 (12,28-19,11)	0,4616
CD8 EM	12,94 (9,97-18,80)	17,91 (11,66-24,42)	< 0,0001
CD8 TEM	11,38 (6,84-15,57)	13,10 (9,62-18,73)	< 0,0001
Células/μL			
CD4 Naïve	413 (297-544)	460 (353-644)	0,0002
CD4 CM	322 (260-391)	398 (343-465)	<0,0001
CD4 EM	83 (61-108)	123 (79-150)	< 0,0001
CD4 TEM	5 (2-8)	6 (2-15)	< 0,0001
CD8 Naïve	258 (171-371)	277 (208-412)	0,0143
CD8 CM	69 (56-107)	91 (69-120)	<0,0001
CD8 EM	67 (49-93)	102 (66-152)	< 0,0001
CD8 TEM	53 (31-94)	75 (45-127)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efectora; TEM – Memória efectora terminal.

Tabela 55 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Linfocitária	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	46,51 (38,23-55,41)	44,39 (36,72-53,36)	0,1434
CD4 CM	37,20 (35,38-45,62)	35,77 (33,66-44,86)	0,0787
CD4 EM	11,03 (7,48-14,65)	13,70 (8,52-17,53)	0,0022
CD4 TEM	0,61 (0,40-1,58)	1,25 (0,62-2,68)	< 0,0001
CD8 Naïve	53,65 (48,36-62,85)	48,89 (39,41-56,24)	0,0035
CD8 CM	14,89 (9,49-21,00)	12,64 (8,49-15,89)	0,0003
CD8 EM	14,17 (9,53-17,77)	15,87 (12,70-21,30)	0,0388
CD8 TEM	13,08 (7,83-19,42)	17,12 (12,97-30,08)	< 0,0001
Células/μL			
CD4 Naïve	393 (288-551)	487 (359-707)	0,0008
CD4 CM	321 (271-414)	409 (330-514)	0,0044
CD4 EM	87 (61-133)	134 (97-189)	< 0,0001
CD4 TEM	5 (3-19)	12 (7-28)	< 0,0001
CD8 Naïve	268 (191-353)	294 (228-382)	0,0269
CD8 CM	79 (48-110)	69 (54-121)	0,6582
CD8 EM	68 (46-91)	92 (84-139)	0,0008
CD8 TEM	66 (29-108)	110 (62-197)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Nos marcadores de ativação surgiram também várias diferenças entre o terceiro trimestre de gravidez e o fim do puerpério. Assim, em percentagem, encontraram-se nas mulheres GS mais células T e T CD4 com expressão de HLA-DR no fim do puerpério, mas menos células a expressar CD25 e CTLA-4. Após o puerpério, os linfócitos T CD8 evidenciaram apenas uma redução no valor percentual de células com expressão de CTLA-4. Para os valores absolutos, na avaliação após o puerpério, encontravam-se diminuídas todas as subpopulações celulares produtoras de HLA-DR em mulheres do grupo GS (tabela 56).

Tabela 56 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Linfocitária	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	10,50 (7,68-14,95)	10,60 (8,48-16,53)	0,0036
CD3 CD25 ⁺	20,06 (17,02-28,37)	17,30 (15,21-23,86)	0,0210
CD3 CTLA-4 ⁺	2,68 (1,51-9,25)	2,22 (1,54-3,11)	0,0122
CD4 HLA-DR ⁺	5,33 (3,66-7,42)	5,98 (4,96-9,13)	< 0,0001
CD4 CD25 ⁺	31,35 (24,46-42,86)	28,91 (24,58-33,71)	0,0487
CD4 CTLA-4 ⁺	2,57 (1,36-8,25)	2,16 (1,38-3,05)	0,0294
CD8 HLA-DR ⁺	18,15 (12,80-24,85)	18,70 (12,76-27,43)	0,3101
CD8 CD25 ⁺	3,30 (2,13-4,86)	3,02 (2,07-4,05)	0,1610
CD8 CTLA-4 ⁺	2,85 (1,67-8,68)	2,25 (1,75-3,23)	0,0063
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	156 (105-184)	202 (141-271)	< 0,0001
CD3 CD25 ⁺	299 (241-331)	314 (232-433)	0,2049
CD3 CTLA-4 ⁺	39 (24-104)	37 (26-48)	0,0905
CD4 HLA-DR ⁺	49 (32-64)	68 (53-92)	< 0,0001
CD4 CD25 ⁺	281 (219-321)	310 (214-386)	0,1095
CD4 CTLA-4 ⁺	26 (10-64)	21 (14-32)	0,1107
CD8 HLA-DR ⁺	98 (54-123)	116 (79-150)	< 0,0001
CD8 CD25 ⁺	15 (12-20)	19 (13-25)	0,1888
CD8 CTLA-4 ⁺	15 (9-37)	13 (10-17)	0,0784

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Na avaliação dos marcadores de ativação em mulheres GA, do terceiro trimestre de gravidez ao fim do puerpério, não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas nos valores percentuais das populações estudadas (tabela 57). No entanto, para as contagens absolutas, na avaliação T3 (pós-parto), documentaram-se valores significativamente mais elevados para todas as subpopulações celulares produtoras de HLA-DR (T, T CD4 e T CD8) em mulheres do grupo GA, tal como observado nas mulheres do grupo GS.

Tabela 57 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Linfocitária	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	12,16 (9,10-19,03)	12,44 (8,94-18,01)	0,6634
CD3 CD25 ⁺	20,11 (18,24-24,67)	17,62 (13,83-25,58)	0,0894
CD3 CTLA-4 ⁺	1,95 (1,36-3,86)	1,67 (1,12-3,03)	0,2102
CD4 HLA-DR ⁺	5,84 (4,15-8,98)	6,66 (5,41-9,35)	0,1875
CD4 CD25 ⁺	32,30 (28,66-35,25)	26,09 (22,47-38,94)	0,1208
CD4 CTLA-4 ⁺	1,87 (1,20-3,90)	1,65 (1,05-2,85)	0,3748
CD8 HLA-DR ⁺	23,19 (17,84-35,63)	22,10 (14,81-32,83)	0,5088
CD8 CD25 ⁺	3,24 (2,44-3,99)	2,58 (1,65-3,99)	0,2182
CD8 CTLA-4 ⁺	2,43 (1,58-4,01)	1,78 (1,10-3,48)	0,1355
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	185 (114-265)	199 (130-410)	0,0107
CD3 CD25 ⁺	268 (212-394)	319 (230-390)	0,2965
CD3 CTLA-4 ⁺	28 (18-58)	29 (17-55)	0,8279
CD4 HLA-DR ⁺	47 (35-80)	75 (52-109)	0,0007
CD4 CD25 ⁺	254 (203-378)	300 (220-372)	0,1803
CD4 CTLA-4 ⁺	16 (11-31)	18 (10-34)	0,8170
CD8 HLA-DR ⁺	114 (66-164)	112 (87-258)	0,0269
CD8 CD25 ⁺	15 (11-23)	15 (10-28)	0,5284
CD8 CTLA-4 ⁺	11 (6-25)	12 (6-25)	0,9345

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Perfil de maturação B do terceiro trimestre ao fim do puerpério

No compartimento B, as diferenças observadas também apontaram para um distanciamento do perfil imune no puerpério em relação ao terceiro trimestre da gravidez. Assim, com a classificação Bm1-5, no puerpério, ocorreram no grupo GS aumentos nas percentagens de células B de memória (Bm1 e Bm5, com tendência no mesmo sentido observada em eBm5), mas também nas percentagens de plasmablastos Bm3+Bm4 e células de transição Bm2'. Só as percentagens de células B naïve foram em sentido contrário, evidenciando uma diminuição após a gravidez. Quanto à abordagem dos valores absolutos, foram exatamente as células B naïve as únicas a não sofrer alteração desde a gravidez até ao fim do puerpério. Todas as restantes subpopulações apresentaram valores significativamente mais elevados no período pós-natal (tabela 58).

Tabela 58 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos B	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
Bm1	7,99 (5,84-11,38)	8,39 (7,12-13,34)	0,0001
Bm2	67,68 (60,34-72,68)	58,03 (52,83-61,48)	< 0,0001
Bm2'	2,64 (1,63-4,39)	6,64 (4,89-10,96)	< 0,0001
Bm3+Bm4	1,54 (1,00-2,44)	3,06 (1,56-4,61)	< 0,0001
Bm5	4,69 (3,70-6,62)	5,75 (4,49-7,59)	< 0,0001
eBm5	10,65 (8,06-14,12)	11,65 (8,92-15,12)	0,0708
Células/μL			
Bm1	12 (9-22)	18 (14-22)	0,0001
Bm2	117 (87-159)	121 (80-160)	0,8273
Bm2'	4 (3-8)	14 (7-24)	< 0,0001
Bm3+Bm4	2 (2-4)	6 (4-9)	< 0,0001
Bm5	8 (6-12)	10 (8-16)	< 0,0001
eBm5	19 (13-26)	22 (15-33)	0,0003

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Quanto à evolução dos perfis do compartimento B nas mulheres do grupo GA, verificou-se que os valores percentuais das subpopulações da classificação Bm1-5 assumiram, na generalidade, o perfil observado em mulheres do grupo GS (tabela 59). A única exceção foi a percentagem de plasmablastos (Bm3+Bm4), que se manteve sem diferenças estatisticamente significativas entre a avaliação T1 (gravidez), e a avaliação T3 (pós-parto), nas mulheres do grupo GA. Para valores absolutos, as semelhanças entre os grupos GA e GS manteve-se, exceto na população de células de memória eBm5, cuja variação nas mulheres GA não alcançou significado estatístico, ao contrário do aumento significativo observado nas mulheres GS.

Tabela 59 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação Bm1-5, entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
Bm1	11,05 (6,74-14,84)	10,57 (8,34-17,46)	0,0291
Bm2	64,08 (59,34-69,90)	57,19 (48,21-63,07)	< 0,0001
Bm2'	3,27 (2,04-6,29)	7,61 (4,88-15,33)	< 0,0001
Bm3+Bm4	1,41 (0,95-2,87)	1,95 (1,14-3,72)	0,2897
Bm5	5,67 (3,81-7,62)	7,19 (5,03-9,26)	0,0395
eBm5	9,64 (7,40-14,66)	9,34 (6,56-14,19)	0,4908
Células/μL			
Bm1	20 (8-34)	27 (16-44)	0,0108
Bm2	115 (92-173)	117 (96-171)	0,8061
Bm2'	6 (4-10)	16 (8-38)	< 0,0001
Bm3+Bm4	3 (2-5)	5 (2-9)	0,0053
Bm5	9 (5-18)	14 (10-21)	0,0053
eBm5	22 (12-25)	21 (15-32)	0,1300

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tendo em consideração a classificação paralela das células B com os marcadores clássicos IgD/CD27, viu-se, em mulheres do grupo GS, igualmente após o puerpério, o aumento significativo dos valores absolutos de todas as subpopulações caracterizadas, com exceção das células não *switched*, que não mostraram diferença com significado estatístico. Para os valores percentuais, também no fim do puerpério, aumentaram significativamente as percentagens de células de transição, células de memória *switched*, células DN e plasmablastos (tabela 60).

Com a classificação clássica, foram identificadas menos diferenças nas mulheres do grupo GA entre o terceiro trimestre de gravidez e o fim do puerpério. Do ponto de vista dos valores percentuais, como mostra a tabela 61, apenas as células de transição reproduziram o perfil observado em mulheres do grupo GS, apresentando-se com valores significativamente mais elevados no período pós-parto, em relação ao terceiro trimestre da gravidez. Para as contagens absolutas, verificou-se no pós-parto uma tendência para valores mais elevados de células B naíve em mulheres do grupo GA, apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa como observado em mulheres do grupo GS. Da mesma forma, as células B DN, com valores absolutos mais elevados no pós-parto em mulheres do grupo GS, não mostraram alteração estatisticamente significativa entre o terceiro trimestre da gravidez e o fim do puerpério nas mulheres do grupo GA. Contudo, as restantes subpopulações B comportaram-se de forma semelhante em mulheres GA e GS, do terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério.

Tabela 60 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos B	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
B naíve	58,59 (50,13-67,93)	58,54 (50,05-65,31)	0,0905
B memória	39,56 (29,18-48,21)	38,35 (31,46-46,68)	0,1574
B memória não <i>switched</i>	23,03 (15,57-32,02)	21,26 (15,71-26,50)	0,5123
B memória <i>switched</i>	13,64 (11,46-18,24)	16,69 (12,40-20,30)	< 0,0001
DN	2,54 (1,66-3,63)	3,12 (1,73-4,06)	0,0209
B de transição	1,87 (1,05-2,63)	5,77 (3,85-7,96)	< 0,0001
Plasmablastos	1,39 (0,97-2,38)	3,07 (2,04-4,96)	< 0,0001
Células/μL			
B naíve	100 (70-149)	120 (73-161)	0,0283
B memória	64 (44-85)	74 (51-108)	0,0066
B memória não <i>switched</i>	35 (23-57)	40 (29-63)	0,1135
B memória <i>switched</i>	24 (18-31)	29 (21-43)	< 0,0001
DN	4 (3-6)	5 (3-8)	0,0072
B de transição	3 (1-5)	12 (5-20)	< 0,0001
Plasmablastos	2 (2-3)	6 (4-8)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Tabela 61 – Comparação do perfil maturativo B periférico, de acordo com a classificação IgD/CD27, entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos B	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
B naíve	59,14 (47,91-69,94)	56,29 (47,14-72,75)	0,4908
B memória	36,50 (27,69-47,33)	40,09 (24,48-48,97)	0,4908
B memória não <i>switched</i>	17,86 (16,33-30,27)	18,63 (15,05-29,26)	0,4389
B memória <i>switched</i>	13,70 (10,65-19,08)	13,88 (10,95-20,58)	0,1140
DN	2,85 (1,98-3,89)	2,86 (1,87-4,59)	0,5646
B de transição	3,20 (1,86-4,35)	5,84 (3,58-10,10)	< 0,0001
Plasmablastos	1,48 (1,00-2,71)	2,02 (1,01-3,85)	0,5984
Células/μL			
B naíve	103 (78-152)	125 (97-168)	0,0815
B memória	60 (45-108)	82 (58-109)	0,0308
B memória não <i>switched</i>	38 (24-62)	45 (30-69)	0,1224
B memória <i>switched</i>	26 (15-35)	32 (23-46)	0,0089
DN	6 (2-7)	7 (3-10)	0,2857
B de transição	6 (3-9)	11 (7-26)	< 0,0001
Plasmablastos	3 (2-6)	6 (2-8)	0,0148

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil, DN – duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Células reguladoras: do terceiro trimestre ao fim do puerpério

Após o puerpério, todas as populações de células reguladoras apresentaram valores absolutos aumentados no grupo GS (tabela 62). Porém, no que se prende com os valores percentuais, só se encontraram diferenças estatisticamente significativas nas células Treg $CD4^+CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$, com valores diminuídos no pós-parto. Uma tendência contrária foi identificada nas células Treg $CD4^+CD25^{Hi}Foxp3^+$, mas sem significado estatístico. No fim do puerpério, a expressão de Foxp3 nas células T $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$ mostrou-se aumentada em relação ao observado no terceiro trimestre de gravidez.

Nas mulheres do grupo GA (tabela 63), as alterações encontradas nas subpopulações de células Treg foram semelhantes ao perfil evolutivo das mulheres do grupo GS. Não se observou, contudo, qualquer variação estatisticamente significativa nas percentagens de células Treg $CD4^+CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ entre terceiro trimestre de gravidez e período pós-parto nas mulheres GA. Em consonância com as mulheres do grupo GS, as mulheres do grupo GA apresentaram expressão aumentada de Foxp3 nas células T $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$ depois do puerpério, em relação aos níveis observados no terceiro trimestre de gravidez.

Para as mulheres GS, as células B com funções reguladoras exibiram um aumento dos respetivos valores absolutos após o puerpério, como se verificou nas contagens absolutas de células B totais. Reportou-se ainda um importante aumento dos valores percentuais de células B $CD24^{Hi}CD38^{Hi}$ após o puerpério, com a comparação das avaliações T1 e T3, em mulheres do grupo GS, a obter diferença estatisticamente significativa para este parâmetro.

O perfil de variação das populações B com funções reguladoras foi semelhante em mulheres do grupo GA. Contudo, nestas mulheres, apenas se verificou uma tendência não significativa para valores absolutos mais elevados da população de células B $CD24^{Hi}CD27^+$ depois do puerpério, tendo esta variação apresentado significado estatístico em mulheres do grupo GS. Salienta-se, tal como em mulheres do grupo GS, o aumento dos valores percentuais e absolutos das células B $CD24^{Hi}CD38^{Hi}$ em mulheres do grupo GA, no fim do puerpério.

Tabela 62 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras, entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Celular	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (%)	7,76 (7,00-9,60)	7,50 (6,83-8,81)	0,0084
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (Células/ μ L)	69 (53-87)	77 (65-103)	0,0012
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,07 (3,96-7,40)	6,63 (5,31-8,16)	0,0546
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	50 (38-63)	71 (55-94)	< 0,0001
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,21 (5,61-6,92)	5,85 (5,23-6,73)	0,1771
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	51 (43-65)	61 (49-77)	< 0,0001
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,49 (1,40-1,59)	1,93 (1,78-2,08)	< 0,0001
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	26,92 (20,52-35,54)	25,76 (21,71-36,01)	0,4471
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	44 (30-71)	57 (34-81)	0,0134
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	1,42 (0,94-2,32)	5,62 (3,76-9,34)	< 0,0001
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	2 (2-4)	11 (5-19)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 63 – Comparação de subpopulações de células T e B reguladoras, entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação Celular	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (%)	8,22 (6,79-8,95)	7,74 (6,99-8,89)	0,3902
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-/dim} (Células/ μ L)	63 (51-84)	84 (66-104)	< 0,0001
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,14 (5,65-7,19)	5,90 (5,49-7,92)	0,7683
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	52 (42-64)	65 (57-86)	0,0002
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,41 (5,28-7,06)	6,15 (5,50-6,86)	0,4559
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	53 (40-66)	68 (52-84)	0,0008
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,64 (1,51-1,77)	1,94 (1,77-2,23)	< 0,0001
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	25,47 (19,05-35,80)	27,26 (18,76-39,22)	0,6231
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	45 (28-75)	59 (44-89)	0,0738
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	1,87 (0,81-3,78)	7,13 (3,97-12,81)	< 0,0001
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	3 (2-6)	14 (7-33)	< 0,0001

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Citocinas e células produtoras de citocinas: do terceiro trimestre ao fim do puerpério

Como exposto na tabela 64, na análise das mulheres do grupo GS, documentou-se um aumento da percentagem das células T produtoras de IFN- γ após a gravidez (avaliação T3). Assim, quer para as células T CD4, quer para as células T CD8, verificou-se um aumento significativo nas subpopulações de células IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/-}, depois do puerpério. Nas células T CD8, encontrou-se também uma menor percentagem de células produtoras de IL17 (IL17⁺IFN- γ), Th17. Com base nesta observação, verificou-se ainda que as contagens absolutas desta população não se encontravam aumentadas na avaliação pós-parto, T3, ao contrário do que se verificou com todas as outras subpopulações T CD4 e T CD8 produtoras de IFN- γ e IL17, que evidenciaram valores absolutos mais elevados depois do puerpério.

De novo se encontrou muita proximidade entre os perfis de evolução de mulheres dos grupos GS e GA, do terceiro trimestre de gravidez ao fim do puerpério, agora em relação às células produtoras de citocinas pró-inflamatórias. Assim, como mostra a tabela 65, nas mulheres do grupo GA, houve um aumento da percentagem de células produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/-}) após o puerpério, tal como visto nas mulheres do grupo GS. De forma diferente, as células T CD8 produtoras de IL17 mantiveram valores percentuais similares entre as duas

observações (terceiro trimestre de gravidez e fim do puerpério) nas mulheres do grupo GA. Para os valores absolutos, destaca-se, no compartimento T CD4 de mulheres do grupo GA, a ausência de diferenças estatisticamente significativas nas células polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺ entre o terceiro trimestre e o fim do puerpério, com as outras subpopulações a evoluir tal como nas mulheres do grupo GS. No compartimento T CD8, as mulheres GA mostraram, no fim do puerpério, um aumento das células produtoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺IL17⁻ e IFN- γ ⁺IL17^{+/-}), como observado em mulheres do grupo GS. No entanto, no grupo GA, há ausência de variação estatisticamente significativa nas células Tc17, bem como nas restantes células T CD8 produtoras de IL17 (IL17⁺IFN- γ ^{+/-} e células polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺).

Tabela 64 – Comparação de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos T	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	34,12 (27,74-41,53)	37,46 (30,80-41,55)	0,0219
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	1,95 (1,50-2,41)	2,16 (1,55-2,59)	0,5318
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,93 (0,71-1,08)	1,00 (0,70-1,24)	0,7537
CD4 IFN- γ ⁺ total	35,13 (28,53-42,57)	38,53 (31,89-42,67)	0,0234
CD4 IL17 ⁺ total	2,85 (2,33-3,55)	3,05 (2,19-3,71)	0,6050
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	52,71 (46,10-59,68)	59,04 (51,43-63,34)	< 0,0001
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,66 (0,42-0,99)	0,52 (0,35-0,72)	0,0048
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,68 (0,53-1,01)	0,88 (0,67-1,16)	0,2843
CD8 IFN- γ ⁺ total	53,32 (46,71-60,47)	59,86 (52,37-64,53)	< 0,0001
CD8 IL17 ⁺ total	1,33 (0,98-2,00)	1,48 (1,01-1,87)	0,5501
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	280 (231-359)	380 (280-462)	< 0,0001
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	17 (13-22)	22 (16-28)	< 0,0001
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	8 (6-10)	10 (7-14)	0,0027
CD4 IFN- γ ⁺ total	287 (235-367)	394 (286-480)	< 0,0001
CD4 IL17 ⁺ total	27 (20-32)	33 (24-43)	0,0001
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	242 (191-339)	361 (244-479)	< 0,0001
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	3 (2-5)	3 (2-4)	0,6330
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	4 (2-5)	5 (4-7)	0,0011
CD8 IFN- γ ⁺ total	257 (194-344)	366 (248-492)	< 0,0001
CD8 IL17 ⁺ total	7 (4-10)	9 (6-11)	0,0440

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 65 – Comparação de células T produtoras de IFN- γ e IL17 entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos T	GA (n=24)	GS POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ^+ (Th1)	31,71 (22,30-44,33)	35,33 (27,28-44,10)	0,0007
CD4 IL17 $^+$ (Th17)	2,13 (1,86-2,60)	2,27 (2,03-2,66)	0,4223
CD4 IFN- γ^+ IL17 $^+$	1,15 (0,90-1,58)	1,02 (0,71-1,23)	0,1424
CD4 IFN- γ^+ total	33,26 (23,29-45,52)	36,04 (28,51-45,41)	0,0022
CD4 IL17 $^+$ total	3,48 (2,85-4,01)	3,29 (2,65-3,81)	0,7469
CD8 IFN- γ^+ (Th1)	51,18 (41,83-67,39)	57,21 (49,98-68,61)	< 0,0001
CD8 IL17 $^+$ (Th17)	0,90 (0,59-1,06)	0,88 (0,41-1,27)	0,2643
CD8 IFN- γ^+ IL17 $^+$	1,01 (0,76-1,44)	0,91 (0,47-1,31)	0,6231
CD8 IFN- γ^+ total	52,61 (43,28-68,08)	58,56 (52,36-69,99)	< 0,0001
CD8 IL17 $^+$ total	1,83 (1,52-2,60)	1,74 (0,93-2,38)	0,4061
Células/μL			
CD4 IFN- γ^+ (Tc1)	289 (200-356)	376 (293-497)	< 0,0001
CD4 IL17 $^+$ (Tc17)	18 (15-22)	22 (19-32)	0,0054
CD4 IFN- γ^+ IL17 $^+$	10 (7-14)	11 (8-14)	0,4122
CD4 IFN- γ^+ total	296 (209-366)	388 (302-508)	< 0,0001
CD4 IL17 $^+$ total	27 (23-35)	36 (27-41)	0,0332
CD8 IFN- γ^+ (Tc1)	238 (203-344)	329 (278-519)	< 0,0001
CD8 IL17 $^+$ (Tc17)	4 (3-6)	4 (3-7)	0,3081
CD8 IFN- γ^+ IL17 $^+$	5 (3-8)	5 (3-7)	0,4675
CD8 IFN- γ^+ total	242 (208-348)	333 (280-522)	< 0,0001
CD8 IL17 $^+$ total	9 (6-14)	11 (6-13)	0,3854

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Na comparação da avaliação da gravidez e do pós-parto em mulheres do grupo GS, a produção de IL10 foi semelhante para as células T. No entanto verificaram-se diferenças com significado estatístico para a produção desta citocina pelas células B. Neste caso, o período pós-parto foi o período que evidenciou uma maior percentagem de células B a produzir IL10, e também contagens absolutas mais elevadas para esta subpopulação B (tabela 66).

As mulheres GA não tiveram diferenças estatisticamente significativas para os valores percentuais das diferentes populações produtoras de IL10 abordadas (tabela 67). Ainda em relação às subpopulações IL10 $^+$, mas para os valores absolutos, as mulheres do grupo GA apresentaram na avaliação final, T3, valores mais elevados de células T (T IL10 $^+$, T CD4 IL10 $^+$ e T CD8 IL10 $^+$), não apresentando variação estatisticamente significativa na população de células B IL10 $^+$, como observado nas mulheres do grupo GS.

Tabela 66 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,77 (0,54-1,01)	0,83 (0,54-1,04)	0,7221
CD4 IL10 ⁺	0,92 (0,65-1,16)	0,95 (0,65-1,18)	0,9025
CD8 IL10 ⁺	0,49 (0,25-0,80)	0,59 (0,36-0,83)	0,3835
CD19 IL10 ⁺	1,00 (0,63-1,53)	1,17 (0,85-1,76)	0,0372
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	10 (7-14)	14 (10-18)	0,0865
CD4 IL10 ⁺	8 (5-12)	9 (7-13)	0,1410
CD8 IL10 ⁺	2 (1-4)	3 (2-5)	0,0967
CD19 IL10 ⁺	2 (1-2)	2 (2-4)	0,0018

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 67 – Comparação de células T e B produtoras de IL10 entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Subpopulação de Linfócitos	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,83 (0,71-1,40)	0,91 (0,65-1,35)	0,9831
CD4 IL10 ⁺	1,00 (0,85-1,61)	1,03 (0,76-1,54)	0,9161
CD8 IL10 ⁺	0,66 (0,36-1,05)	0,65 (0,37-1,23)	0,8718
CD19 IL10 ⁺	1,26 (0,97-1,64)	1,24 (0,84-1,67)	0,8498
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	14 (9-16)	15 (13-23)	0,0074
CD4 IL10 ⁺	10 (7-12)	11 (9-13)	0,0106
CD8 IL10 ⁺	3 (2-5)	4 (3-9)	0,0065
CD19 IL10 ⁺	2 (1-3)	3 (2-4)	0,3902

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Apesar de, em termos séricos, haver uma tendência para uma maior concentração de IFN-γ após a gravidez, as diferenças entre a gravidez e pós-parto não assumem significado estatístico em mulheres do grupo GS. Também as concentrações séricas de IL4 não diferem entre as avaliações T1 e T3 nas mulheres do grupo GS (tabela 68).

Nas mulheres atópicas (grupo GA), não se verificou qualquer diferença estatisticamente significativa nas concentrações séricas de IL4 e IFN-γ entre o terceiro trimestre da gravidez e o fim do puerpério. Estes resultados constam da tabela 69.

Tabela 68 – Comparação das concentrações séricas de IL4 e IFN- γ entre mulheres grávidas saudáveis, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Citocina	GS (n=43)	GS POS PARTO (n=43)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,3)*	0,3 (0,3-1,3)*	0,5000
IFN (pg/mL)	24,3 (8,1-44,2)	61,8 (21,4-118,0)	0,0876

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo; máximo).

GS – Grávidas saudáveis na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GS POS PARTO - Grávidas saudáveis na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

Tabela 69 – Comparação das concentrações séricas de IL4 e IFN- γ entre mulheres grávidas atópicas, na avaliação T1 (gravidez) e na avaliação T3 (pós-parto).

Citocina	GA (n=24)	GA POS PARTO (n=24)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,8)*	0,3 (0,3-4,0)*	0,5000
IFN (pg/mL)	12,3 (2,8-23,9)	14,9 (2,8-21,6)	0,9798

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo; máximo).

GA – Grávidas atópicas na avaliação T1 (terceiro trimestre da gravidez), GA POS PARTO - Grávidas atópicas na avaliação T3 (>6 semanas após o parto), Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil.

4.6 Avaliação após o puerpério

Da avaliação evolutiva das mulheres dos grupos GA e GS desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério, destaca-se o grande número de alterações observado ao nível dos diferentes elementos imunes avaliados. Assim, de seguida foram comparar-se os parâmetros imunes das avaliações finais (T3) destas mulheres (grupos GS e GA), com os parâmetros observados nos grupos NGS e NGA respetivamente.

GS no pós-parto e NGS

Nesta comparação, salientam-se apenas alguns elementos com diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres do grupo NGS e as mulheres do grupo GS (depois do puerpério).

Como mostra a figura 24, para os leucócitos, verificaram-se apenas alterações nos eosinófilos, cujas percentagens ($p=0,0256$; teste de Mann-Whitney U) e contagens absolutas ($p=0,0333$; teste de Mann-Whitney U) se apresentaram com valores mais elevados nas mulheres do grupo GS após o puerpério, em relação às mulheres do grupo NGS. As contagens absolutas de monócitos encontravam-se contudo mais elevadas ($p=0,0346$; teste de Mann-Whitney U) nas mulheres do grupo NGS.

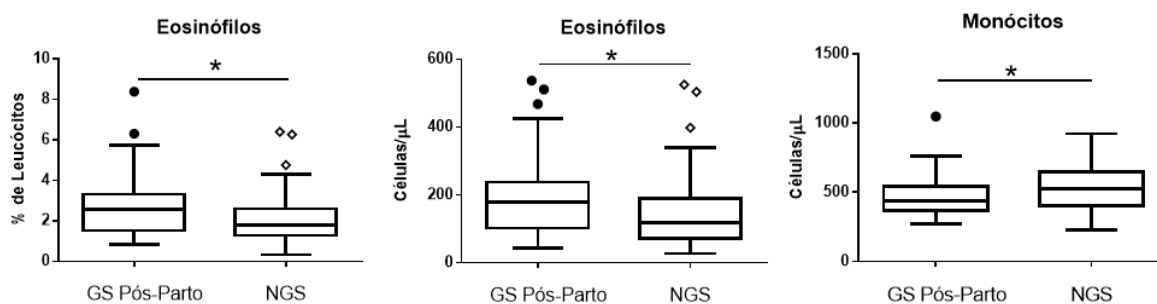


Figura 24 – Comparação das populações de Eosinófilos (% e contagem absoluta) e Monócitos (contagem absoluta) entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis, * p<0,05.

Para as subpopulações linfocitárias, foi possível documentar que as mulheres do grupo GS no período pós-parto apresentavam percentagens superiores de células T (p<0,0001; teste de Mann-Whitney U), T CD4 (p=0,0369; teste de Mann-Whitney U) e T CD8 (p=0,0403; teste de Mann-Whitney U). Nas mulheres GS, mantêm-se no período pós parto valores mais baixos de células B, em percentagem (p<0,0001, teste de Mann-Whitney U) e valor absoluto (p=0,0146; teste de Mann-Whitney U), como se vê na figura 25.

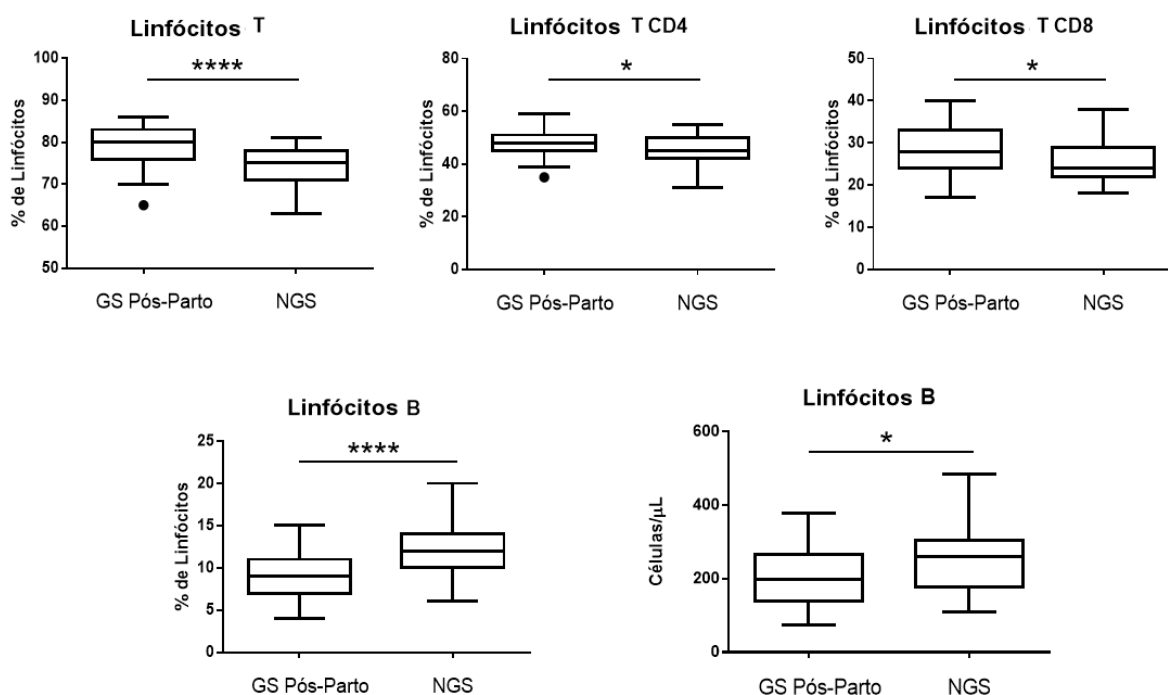


Figura 25 – Comparação das subpopulações de Linfócitos com diferenças estatisticamente significativas em valor percentual e/ou absoluto, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis, * p<0,05 e **** p<0,0001.

Verificou-se apenas uma alteração em relação ao perfil maturativo, com as células T CD4 de memória central a mostrarem-se mais elevadas nas mulheres do grupo NGS em relação às mulheres do grupo GS no fim do puerpério ($p=0,0111$; teste de Mann-Whitney U). Nas mulheres NGS, estavam igualmente elevadas as percentagens de células T CTLA-4⁺: células T totais ($p=0,0316$; teste de Mann-Whitney U), células T CD4 ($p=0,0465$; teste de Mann-Whitney U) e células T CD8 ($p=0,0154$; teste de Mann-Whitney U). As contagens absolutas de células T CD8 CTLA-4⁺ também estavam aumentadas nas mulheres do grupo NGS em comparação com as mulheres do grupo GS após o puerpério ($p=0,0283$; teste de Mann-Whitney U), como mostra a figura 26.

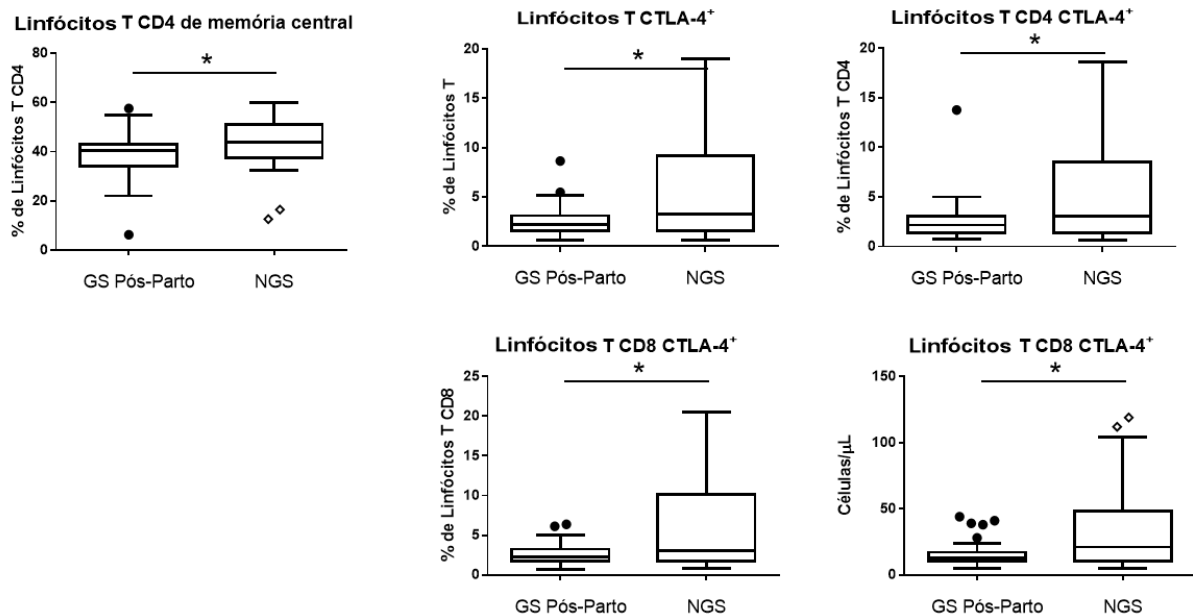


Figura 26 – Comparação das subpopulações de Linfócitos T estudadas no perfil maturativo e no perfil de ativação com diferenças estatisticamente significativas em valor percentual e/ou absoluto, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis, * $p < 0,05$.

Para as células B encontraram-se sobretudo diferenças nos valores absolutos das distintas populações do perfil maturativo. Assim, em linha com os valores absolutos da população B total, encontraram-se também diferenças estatisticamente significativas nas contagens de célula Bm1 ($p=0,0166$; teste de Mann-Whitney U), Bm2 ($p=0,0402$; teste de Mann-Whitney U) e Bm5 ($p=0,0161$; teste de Mann-Whitney U), diminuídas em mulheres GS no fim do puerpério, como é visível na figura 27.

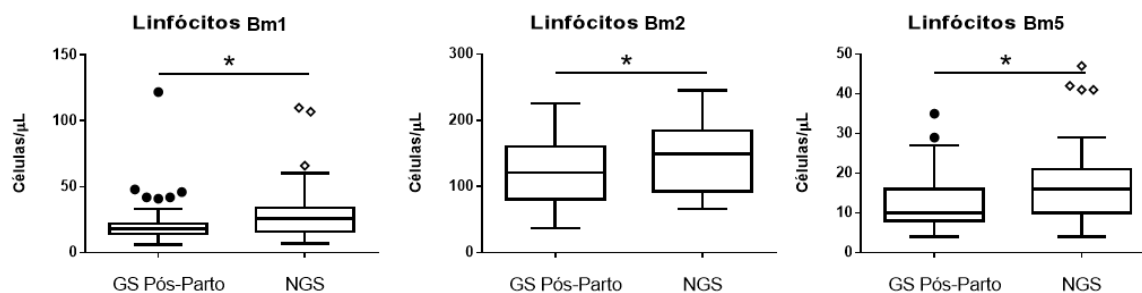


Figura 27 – Comparação das subpopulações de Linfócitos B (segundo a classificação Bm1-5) com diferenças estatisticamente significativas em valor absoluto, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis, * p<0,05.

Com a classificação clássica, observaram-se diferenças nas subpopulações de células B naïve, DN e de transição. Em relação às células B naïve e às células B DN, a tendência até aqui manteve-se, com as mulheres GS no pós-parto a mostrar valores absolutos mais baixos (células B naïve, p=0,0253; células B DN, p=0,0003; teste de Mann-Whitney U). As células B DN estavam igualmente diminuídas em percentagem (p=0,0168; teste de Mann-Whitney U), mas mais interessante foi a observação de percentagens mais elevadas de células B de transição nas mulheres GS após o puerpério (p=0,0006; teste de Mann-Whitney U), como se vê na figura 28.

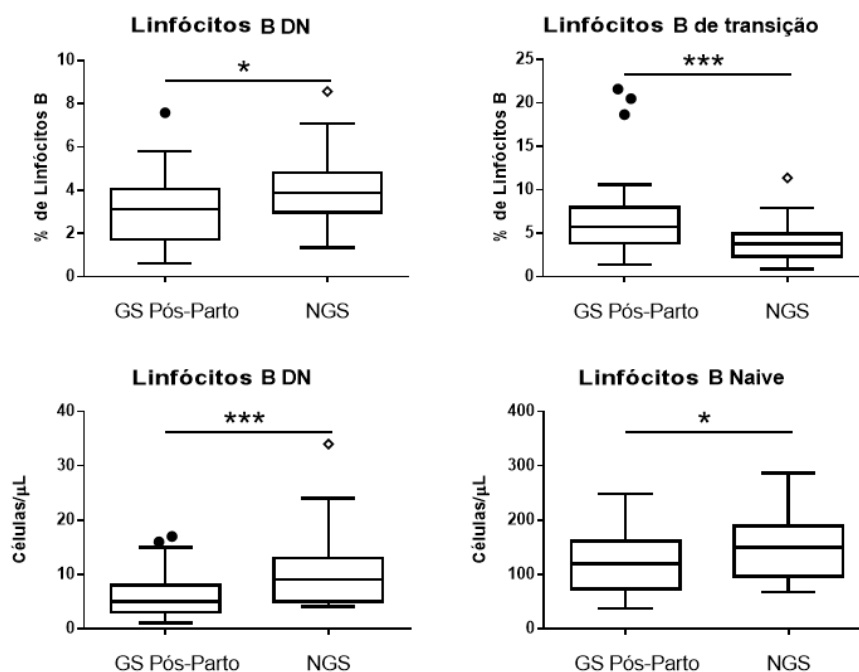


Figura 28 – Comparação das subpopulações de Linfócitos B (segundo a classificação de IgD/CD27) com diferenças estatisticamente significativas em valor percentual e/ou absoluto, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

DN – Duplos negativos IgD⁻CD27⁻; GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis, * p<0,05 e *** p<0,001.

Finalmente as populações de células T reguladoras tiveram um comportamento discrepante entre si, mostrando apenas diferenças significativas entre os grupos NGS e GS no fim do puerpério na população Treg CD4⁺CD25^{Hi}Foxp3⁺. As percentagens e as contagens absolutas desta população, com $p=0,0052$ e $p=0,0030$ (teste de Mann-Whitney U), respetivamente, encontravam-se aumentadas nas mulheres GS após o puerpério, em relação a mulheres do grupo NGS. A subpopulação B CD24^{Hi}CD38^{Hi} apresentava-se igualmente aumentada nas mulheres do grupo GS após o puerpério, comparadas com mulheres NGS ($p=0,0005$; teste de Mann-Whitney U), como se mostra na figura 29.

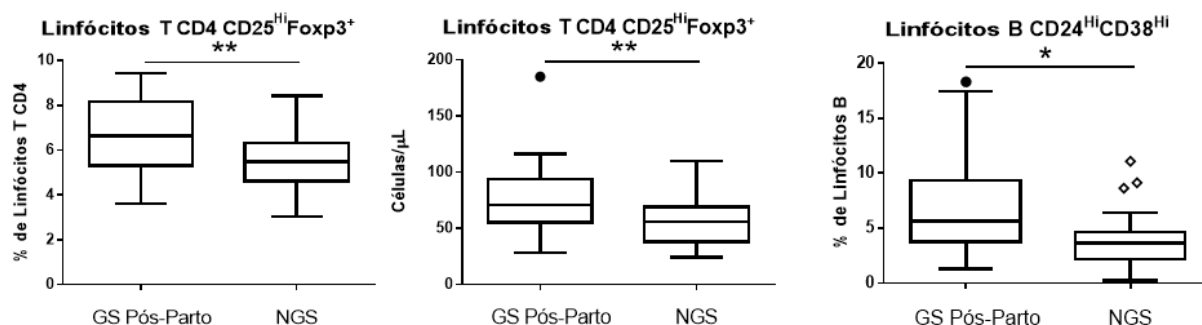


Figura 29 – Comparação das populações de células T e B reguladoras com diferenças estatisticamente significativas em valor percentual e/ou absoluto, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

Em relação ao perfil citocínico, após o puerpério, as mulheres do grupo GS apresentaram apenas diferenças em relação às mulheres do grupo NGS no que se refere à população de células B produtoras de IL10, mais representadas percentualmente no primeiro grupo ($p=0,0193$; teste de Mann-Whitney U). Esta comparação está representada na figura 30.

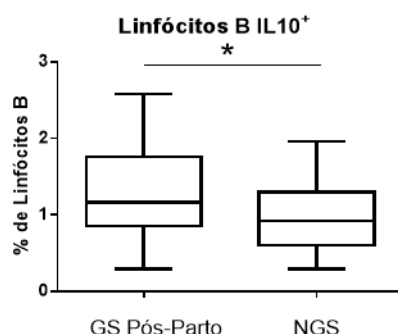


Figura 30 – Comparação da população de células B produtoras de IL10, com diferenças estatisticamente significativas em valor percentual, entre mulheres grávidas saudáveis após o puerpério, e mulheres não grávidas saudáveis.

GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGS – Não grávidas saudáveis. * $p<0,05$.

GA no pós-parto e NGA

Seguindo o racional da comparação anterior, verificou-se também de que forma as mulheres do grupo GA se mostraram no período pós-parto, em relação às mulheres do grupo NGA. Começando a comparação com os leucócitos, como mostra a figura 31, verificaram-se apenas alterações de contagens celulares, com as mulheres do grupo GA a mostrarem após o puerpério valores absolutos de monócitos ($p=0,063$; teste de Mann-Whitney U), linfócitos ($p=0,0326$; teste de Mann-Whitney U), basófilos ($p=0,0014$; teste de Mann-Whitney U) e leucócitos totais ($p=0,0230$; teste de Mann-Whitney U) inferiores aos observados nas mulheres do grupo NGA.

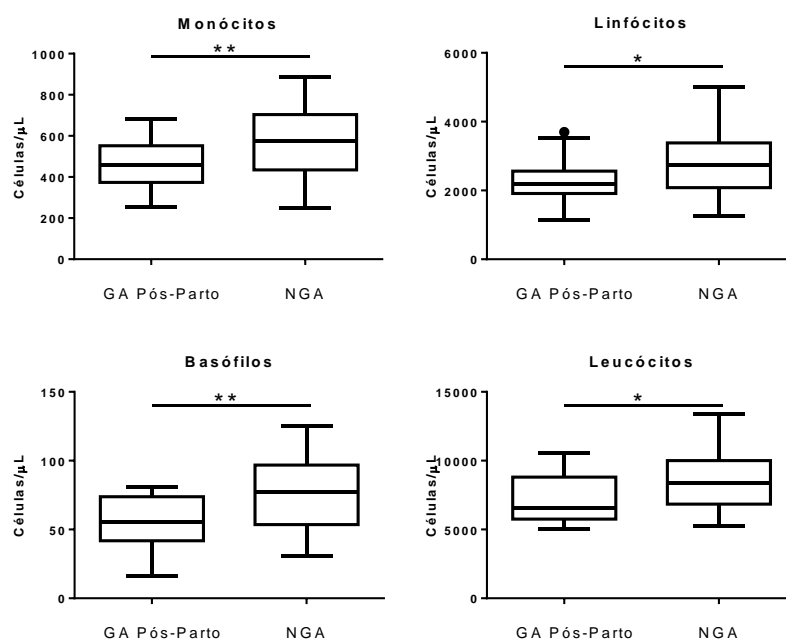


Figura 31 – Comparação das populações de Leucócitos, com diferenças estatisticamente significativas em valor absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.

* $p < 0,05$, e ** $p < 0,01$.

Para as subpopulações linfocitárias, as mulheres dos grupos NGA e GA no fim do puerpério mostraram-se consideravelmente próximas, aparentando ter contudo diferenças no compartimento B total, isto é, as mulheres GA continuaram a apresentar, após o puerpério, valores percentuais ($p=0,0005$; teste de Mann-Whitney U) e absolutos ($p=0,0001$; teste de Mann-Whitney U) diminuídos para a população B em relação às mulheres NGA (figura 32).

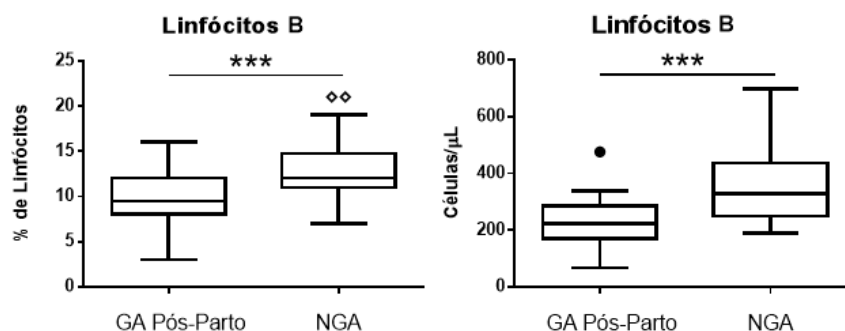


Figura 32 – Comparação das populações de Linfócitos, com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.
*** $p < 0,001$.

Tal como mostra a figura 33, em relação ao perfil maturativo, só os valores absolutos de células T CD4 de memória efetoras se mostraram mais baixos nas mulheres GA no fim do puerpério ($p = 0,0032$; teste de Mann-Whitney U), comparadas com mulheres NGA. Observou-se ainda que as mulheres GA no fim do puerpério evidenciavam igualmente contagens absolutas mais baixas de células T ativadas CD25⁺ ($p = 0,389$; teste de Mann-Whitney U) e de células T CD8 ativadas CD25⁺ ($p = 0,0403$; teste de Mann-Whitney U).

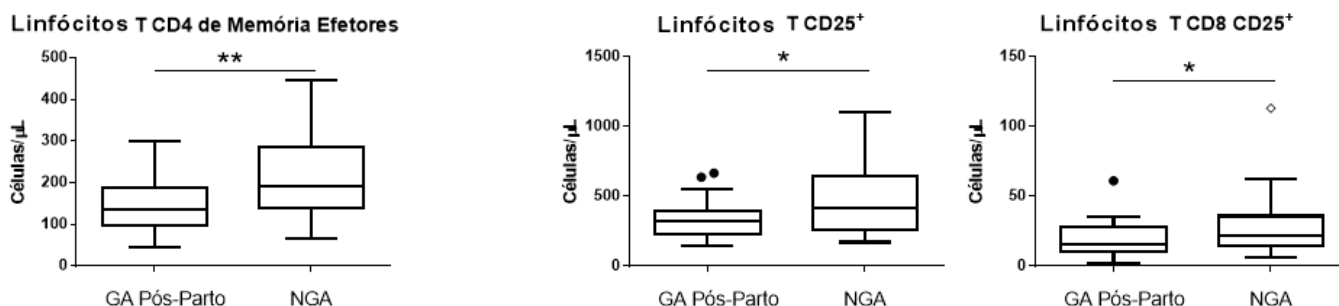


Figura 33 – Comparação das subpopulações de Linfócitos T estudadas no perfil maturativo e no perfil de ativação, com diferenças estatisticamente significativas em valor absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tal como observado na comparação semelhante em mulheres saudáveis, a comparação de mulheres GA após o puerpério e mulheres NGA mostrou, para as células B, diferenças nos valores absolutos de várias subpopulações do seu perfil maturativo. Em linha com os valores mais baixos observados na população B total após o puerpério, as contagens absolutas de células Bm1 ($p = 0,0012$; teste de Mann-Whitney U), Bm2 ($p = 0,0006$; teste de Mann-Whitney U), Bm5 ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney U) e eBm5 ($p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney U),

encontravam-se diminuídas em mulheres GA (após o puerpério). No entanto, também na abordagem dos valores percentuais se encontraram diferenças entre mulheres NGA e GA após o puerpério. Assim, se as mulheres GA após o puerpério apresentavam percentagens mais elevadas de células Bm2' ($p=0,0012$; teste de Mann-Whitney U) e Bm3+Bm4 ($p=0,001$; teste de Mann-Whitney U), as mulheres NGA apresentavam maior percentagem de células Bm5 ($p=0,0432$; teste de Mann-Whitney U), tal como representado na figura 34.

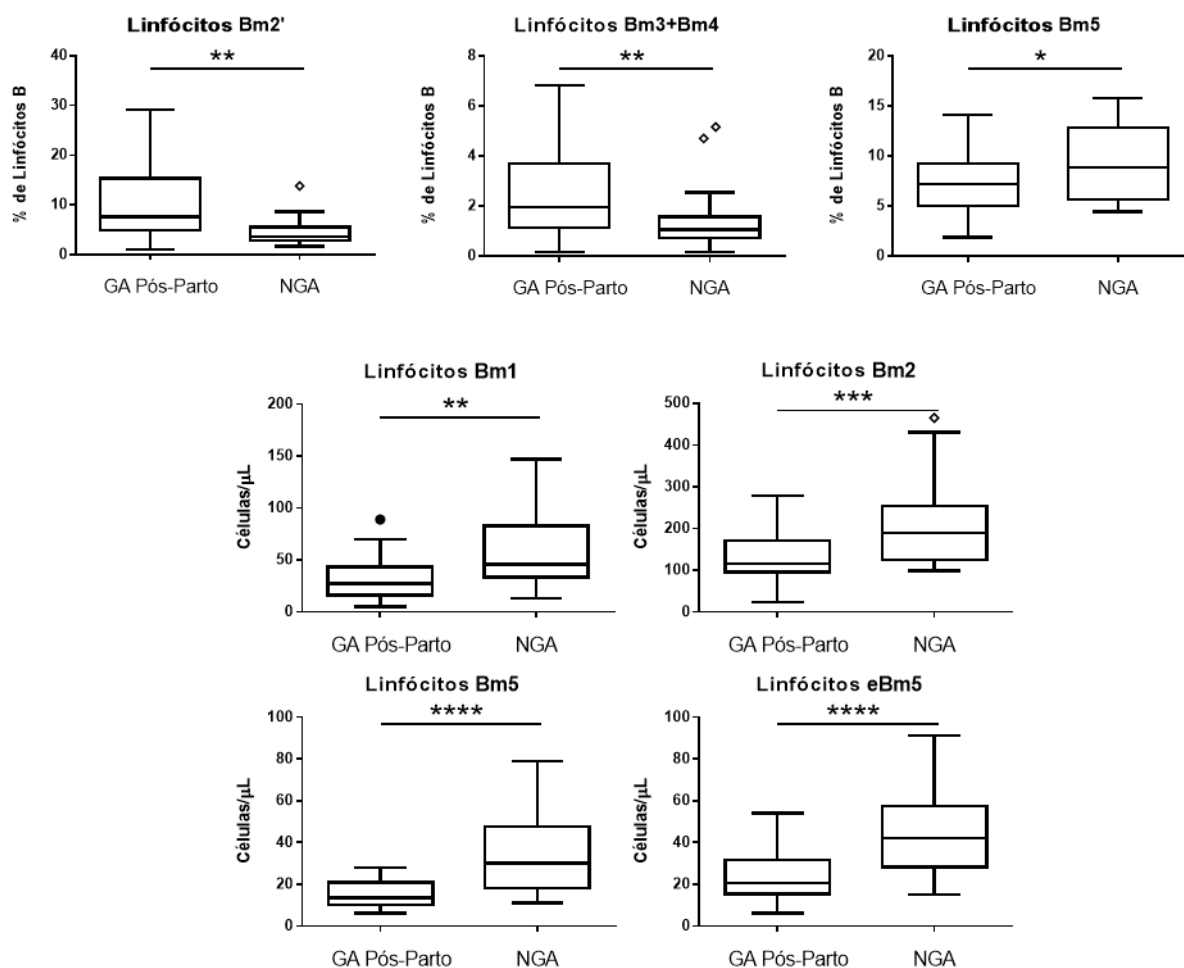


Figura 34 – Comparação das populações de Linfócitos B (segundo a classificação Bm1-5), com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e/ou absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.

A classificação clássica IgD/CD27 apresentou, na generalidade, dados semelhantes à classificação Bm1-5, com todas as subpopulações B a evidenciar valores absolutos mais baixos em mulheres GA (naïve, $p=0,0015$; memória, $p=0,0002$; memória não *switched*, $p=0,0022$; memória *switched*, $p<0,0001$; DN, $p=0,0304$; teste de Mann-Whitney U) após o puerpério, exceto as células B de transição e os plasmablastos. Estas duas populações foram as que apresentaram um comportamento distinto, evidenciando-se percentualmente aumentadas nas

mulheres GA após o puerpério (células B de transição, $p=0,0019$; plasmablastos, $p=0,0094$; teste de Mann-Whitney U) em relação a mulheres NGA (figura 35).

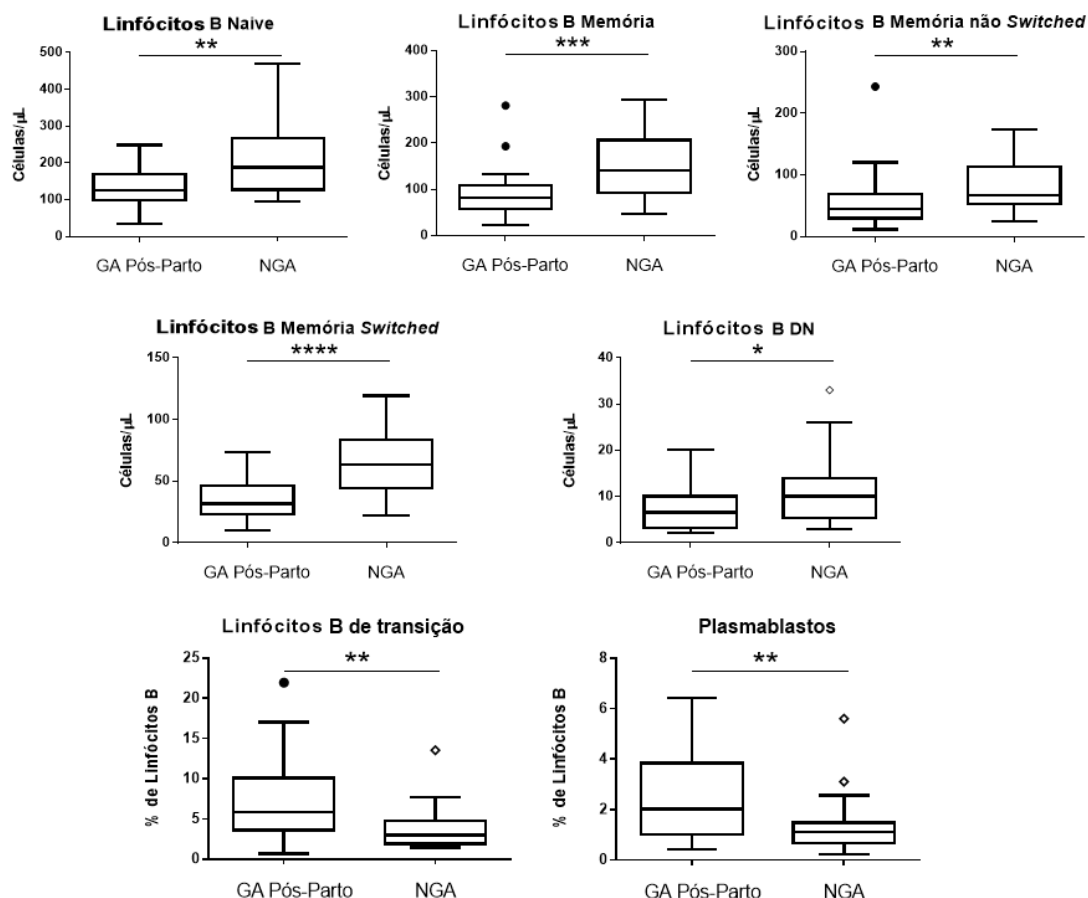


Figura 35 – Comparação das populações de Linfócitos B (segundo a classificação de IgD/CD27), com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e/ou absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

DN – duplos negativos IgD⁻CD27⁻; GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.

Encontraram-se ainda algumas alterações na abordagem das células reguladoras, como se observa na figura 36. Concretamente, em relação às mulheres NGA, as mulheres GA após o puerpério apresentaram contagens absolutas mais elevadas das populações de células Treg CD4^{Dim}CD25^{Hi} ($p=0,0414$; teste de Mann-Whitney U) e células B CD24^{Hi}CD27⁺ ($p=0,0001$; teste de Mann-Whitney U). Tal como na comparação entre mulheres GS no fim do puerpério e mulheres NGS, também aqui as mulheres GA apresentaram a subpopulação B CD24^{Hi}CD38^{Hi} percentualmente aumentada após o puerpério, comparadas com mulheres NGA ($p=0,0025$; teste de Mann-Whitney U).

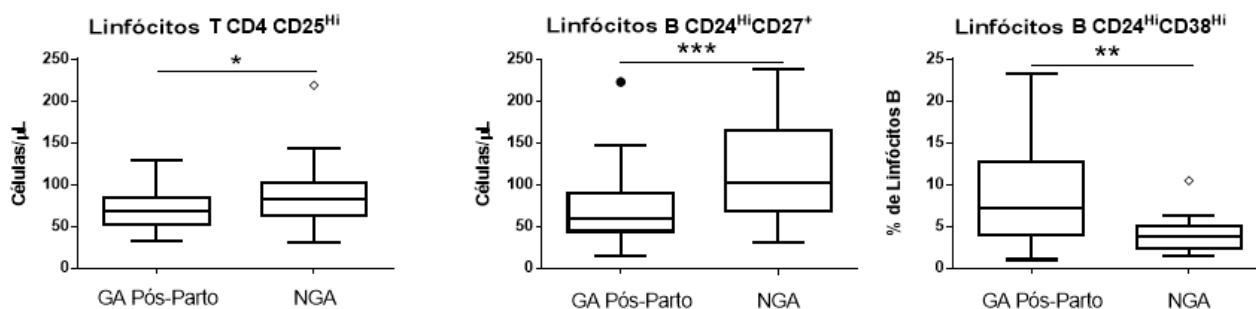


Figura 36 – Comparação das populações de células T e B reguladoras, com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e/ou absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Só ao nível dos valores absolutos se observaram diferenças entre mulheres do grupo GA após o puerpério e mulheres do grupo NGA para os perfis citocínicos (figura 37). Desta forma, verificaram-se diferenças nas populações de células Th1 ($\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL17}^-$) e células produtoras de $\text{IFN-}\gamma$ ($\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL17}^{+/}$), ambas diminuídas em mulheres do grupo GA após o puerpério ($p = 0,0181$ e $p = 0,0176$, respetivamente, teste de Mann-Whitney U). As células B produtoras de IL10 encontravam-se igualmente com contagens absolutas mais baixas nas mulheres do grupo GA após o puerpério ($p = 0,0344$, teste de Mann-Whitney U), em relação a mulheres NGA. Para as citocinas séricas avaliadas (IL-4 e $\text{IFN-}\gamma$) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NGA e GA pós-parto.

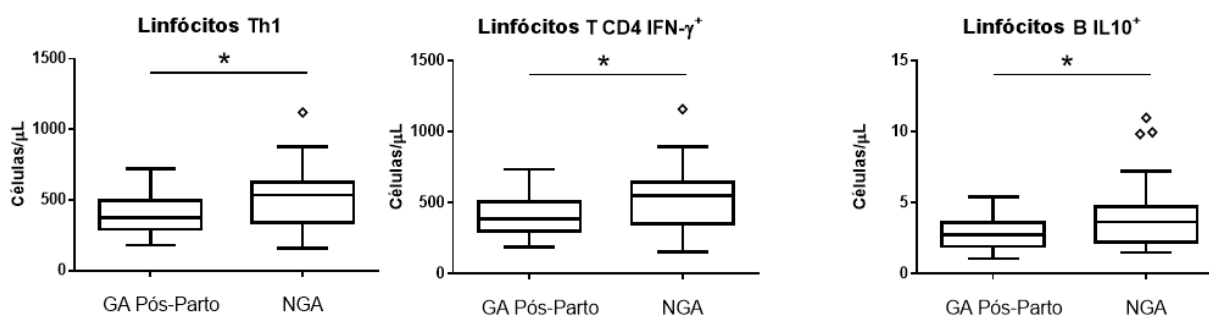


Figura 37 – Comparação das populações de células T e B produtoras de citocinas, com diferenças estatisticamente significativas em valor absoluto, entre mulheres grávidas atópicas após o puerpério, e mulheres não grávidas atópicas.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), NGA – Não grávidas atópicas.
* $p < 0,05$.

GA e GS no pós-parto

Foram também comparadas as mulheres GA e GS após o puerpério (figura 38). Assim, há a relatar pequenas alterações nos parâmetros imunológicos destas mulheres neste período final. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na abordagem das populações leucocitárias e linfocitárias totais. Apenas no compartimento T se identificaram alterações, com as mulheres GA a apresentar valores mais elevados de células T de memória efetoras terminais. Para as células T CD4 encontrou-se diferença estatisticamente significativa nos valores percentuais ($p=0,0083$; teste de Mann-Whitney U) e nos valores absolutos ($p=0,0072$; teste de Mann-Whitney U) das células TEM. Nos linfócitos T CD8, a diferença foi significativa apenas nos valores percentuais ($p=0,0219$; teste de Mann-Whitney U), enquanto nos valores absolutos se apresentou apenas uma tendência para valores mais elevados, sem significado estatístico ($p=0,0571$; teste de Mann-Whitney U).

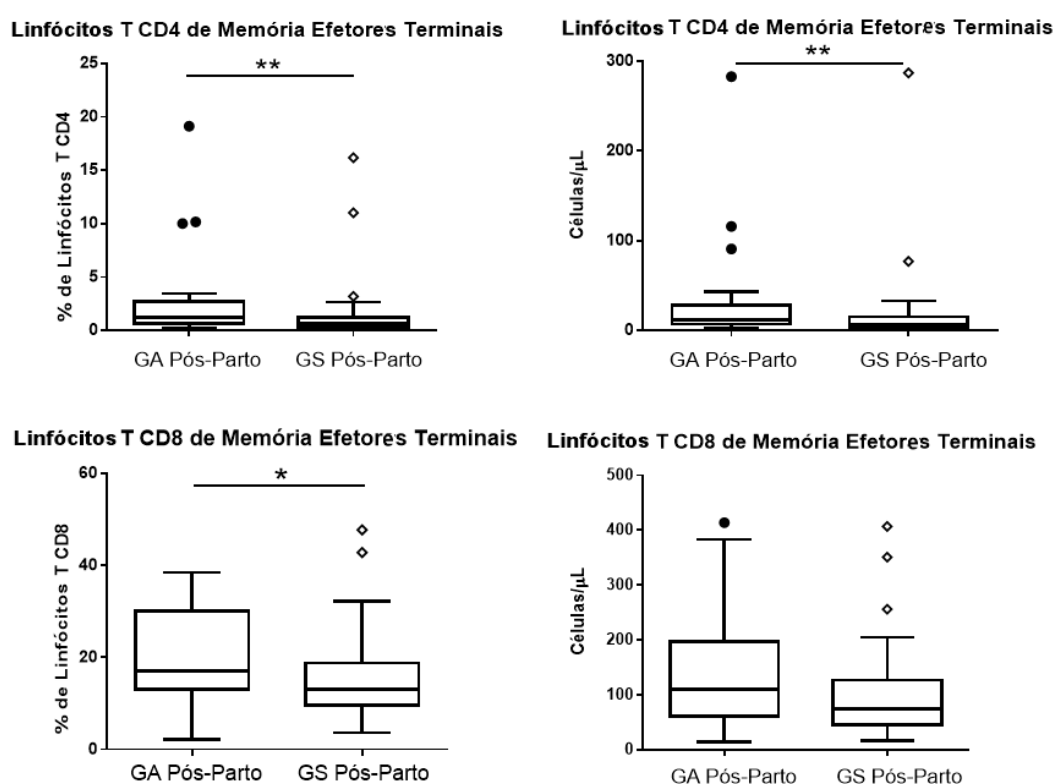


Figura 38 – Comparação das subpopulações de Linfócitos T estudadas no perfil maturativo e no perfil de ativação, com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e/ou absoluto, entre mulheres grávidas atópicas e mulheres grávidas saudáveis após o puerpério.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

Em relação às células B, este compartimento apresentou discretas variações entre mulheres GA e GS após o puerpério. Com a classificação Bm1-5, só a percentagem de células Bm1 se encontrava aumentada significativamente nas mulheres GA ($p=0,0298$; teste de Mann-Whitney U), como se representa na figura 39.

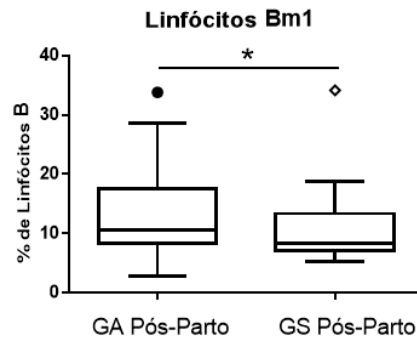


Figura 39 – Comparação das populações do perfil B maturativo (segundo a classificação Bm1-5), com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo, entre mulheres grávidas atópicas e mulheres grávidas saudáveis após o puerpério.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto). * $p < 0,05$.

Utilizando a classificação clássica, apenas se verificou uma percentagem mais baixa de plasmablastos nas mulheres GA ($p = 0,0216$; teste de Mann-Whitney U), com todos os outros parâmetros a não apresentar diferença estatisticamente significativa entre mulheres GA e GS após o puerpério (figura 40).

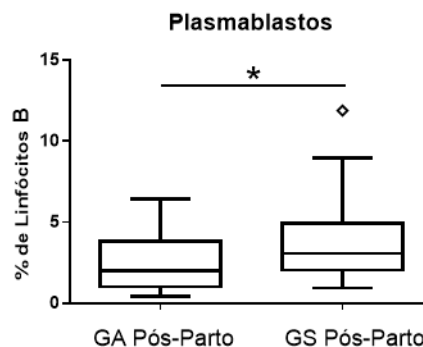


Figura 40 – Comparação das populações do perfil B maturativo (segundo a classificação de IgD/CD27), com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo, entre mulheres grávidas atópicas e mulheres grávidas saudáveis após o puerpério.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto). * $p < 0,05$.

Do ponto de vista das avaliações funcionais, apenas uma população se destacou com diferenças estatisticamente significativas entre mulheres GA e GS no fim do puerpério: as células T CD8 produtoras de IL17, com valores percentuais ($p = 0,0215$; teste de Mann-Whitney U) e valores absolutos ($p = 0,0107$; teste de Mann-Whitney U) mais elevados em mulheres GA (figura 41).

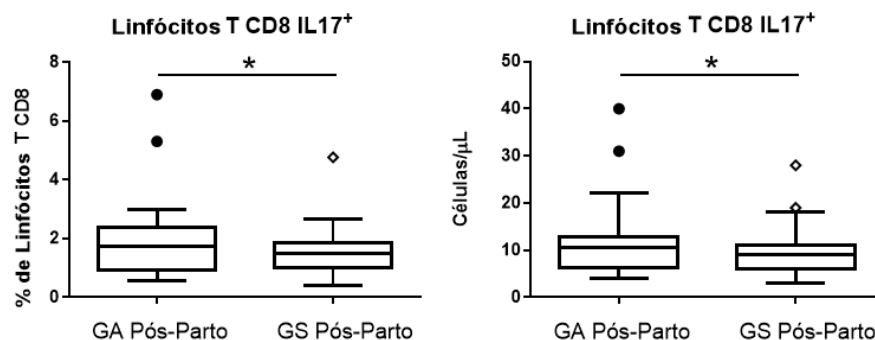


Figura 41 – Comparação das populações de células T e B produtoras de citocinas, com diferenças estatisticamente significativas em valor relativo e/ou absoluto, entre mulheres grávidas atópicas e mulheres grávidas saudáveis após o puerpério.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto). * p<0,05.

Há ainda a considerar os níveis séricos de IFN- γ , que como nas restantes comparações de mulheres GA versus mulheres GS, também no fim do puerpério se mostraram mais baixos nas mulheres do grupo GA (p<0,0001; teste de Mann-Whitney U), em relação às mulheres do grupo GS (figura 42).

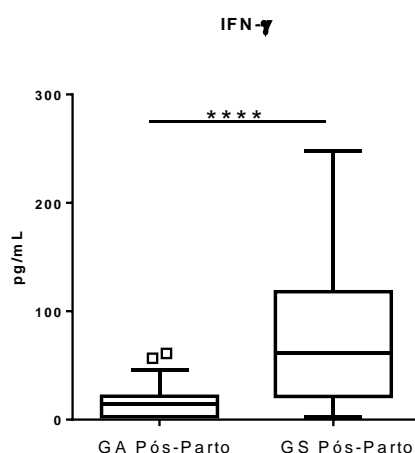


Figura 42 – Comparação das concentrações séricas de IFN- γ , entre mulheres grávidas atópicas e mulheres grávidas saudáveis após o puerpério.

GA POS PARTO – Grávidas atópicas na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto), GS POS PARTO – Grávidas saudáveis na avaliação temporal 3 (T3 – pós-parto). **** p<0,0001.

4.7 Gravidez na mulher com asma atópica: marcadores de risco para o desenvolvimento de atopia na descendência

A análise das mulheres GA de acordo com a observação, nas respetivas crianças, de manifestações de risco para a atopia até aos 6 meses de idade, isto é, intercorrências alérgicas (eczema, sibilância recorrente, alergia alimentar), foi efetuada com o intuito de identificar alterações nos parâmetros imunológicos maternos que pudessem relacionar-se com as características das crianças.

Da análise das tabelas apresentadas de seguida, é possível observar que as diferenças entre mulheres GA com intercorrências alérgicas na descendência (GA DA) e mulheres GA sem intercorrências alérgicas na descendência (GA SDA) se restringem a alguns parâmetros imunológicos: as percentagens de células T e de células B, em relação ao total de linfócitos; a percentagem de células T CD8 de memória efetoras (EM); as contagens absolutas de células B Bm1; as percentagens de células B de transição; as contagens absolutas de células B de memória e de células B de memória não *switched*; e as percentagens de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}.

Populações leucocitárias

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre mulheres com e sem intercorrências alérgicas na sua descendência durante os primeiros seis meses de vida na avaliação de populações leucocitárias (tabela 70).

Tabela 70 – Comparação das populações leucocitárias entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

População Celular	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
Neutrófilos	71,99 (66,33-73,74)	71,39 (69,73- 73,69)	0,9198
Monócitos	7,86 (6,67-8,39)	6,86 (5,90- 7,51)	0,0954
Linfócitos	18,79 (16,81-21,29)	20,15 (17,91- 22,13)	0,3937
Basófilos	0,378 (0,32-0,53)	0,34 (0,24- 0,47)	0,3707
Eosinófilos	1,78 (0,99-3,20)	1,51 (0,95- 1,86)	0,4331
Células/μL			
Neutrófilos	6337 (4944-7684)	6780 (5223- 8593)	0,5708
Monócitos	670 (597-720)	586 (472- 723)	0,2829
Linfócitos	1740 (1488-2082)	1675 (1480- 2289)	0,8210
Basófilos	36 (28-52)	31 (26- 41)	0,3624
Eosinófilos	149 (102-262)	130 (85- 204)	0,4804
Leucócitos totais	8765 (7668-10534)	9468 (7580- 11295)	0,6504

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Subpopulações linfocitárias

Na comparação entre mulheres GA com e sem intercorrências alérgicas na sua descendência durante os primeiros seis meses de vida, observaram-se valores percentuais significativamente mais elevados de linfócitos T e mais baixos de linfócitos B nas mulheres GA DA, como se vê na tabela 71.

Tabela 71 – Comparação das subpopulações linfocitárias entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

População Celular	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
Linfócitos T (%)	81 (77-83)	76 (72-79)	0,0193
Linfócitos T (Células/ μ L)	1386 (1087-1660)	1285 (1094-1721)	0,7879
Linfócitos B (%)	9 (7-11)	12 (10-15)	0,0240
Linfócitos B (Células/ μ L)	144 (122-248)	221 (149-281)	0,1584
Células NK (%)	10 (9-11)	12 (8-15)	0,2501
Células NK (Células/ μ L)	174 (105-210)	218,5 (158-233)	0,2180
Células NKT (%)	4 (4-8)	6 (4-8)	0,7829
Células NKT (Células/ μ L)	88 (44-154)	93 (63-176)	0,6352
Linfócitos T CD4 (%)	49 (47-53)	47 (43-49)	0,1658
Linfócitos T CD4 (Células/ μ L)	833 (670-1129)	791 (678- 1087)	0,8765
Linfócitos T CD8 (%)	29 (23-36)	27 (24- 30)	0,3463
Linfócitos T CD8 (Células/ μ L)	446 (381-594)	478 (410- 568)	0,8653
Razão CD4/CD8	1,79 (1,32-2,11)	1,64 (1,54- 2,06)	0,7519

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Perfil de maturação e ativação T periférico

Apenas a população de células T CD8 de memória efetoras apresentou valores significativamente diferentes entre mulheres do grupo GA com e sem intercorrências alérgicas na sua descendência, durante os primeiros seis meses de vida, com o primeiro grupo a apresentar valores percentuais mais baixos desta subpopulação celular. Não houve alterações a reportar em relação às subpopulações de linfócitos T, relativamente à expressão de marcadores de ativação (tabelas 72 e 73).

Tabela 72 – Comparação do perfil maturativo T periférico entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos T	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
CD4 Naïve	45,82 (39,22-55,14)	50,16 (36,64-55,69)	> 0,9999
CD4 CM	42,65 (36,46-46,04)	36,44 (33,00-44,63)	0,1535
CD4 EM	7,55 (6,69-14,41)	13,14 (9,29-14,94)	0,0985
CD4 TEM	0,69 (0,36-1,99)	0,60 (0,46-1,90)	0,7195
CD8 Naïve	54,94 (50,01-63,87)	51,82 (44,34-63,06)	0,3384
CD8 CM	16,03 (9,24-21,86)	13,41 (9,64-22,90)	0,9435
CD8 EM	10,54 (7,61-14,25)	17,26 (9,66-20,70)	0,0478
CD8 TEM	11,56 (5,58-20,34)	13,51 (8,24-18,92)	0,6504
Células/μL			
CD4 Naïve	381 (274-595)	393 (304-522)	> 0,9999
CD4 CM	315 (280-439)	325 (248-375)	0,7879
CD4 EM	68 (53-106)	109 (76-152)	0,1055
CD4 TEM	5 (2-22)	5 (3-185)	0,6227
CD8 Naïve	277 (217-372)	243 (179-328)	0,4331
CD8 CM	73 (52-118)	84 (47-101)	0,9885
CD8 EM	55 (35-72)	78 (54-113)	0,0712
CD8 TEM	57 (23-107)	79 (34-111)	0,5556

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil, CM – Memória central; EM – Memória efetora; TEM – Memória efetora terminal.

Tabela 73 – Comparação do perfil de ativação T periférico entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos T	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
CD3 HLA-DR ⁺	17,65 (9,79-25,95)	11,73 (8,24-14,52)	0,1906
CD3 CD25 ⁺	21,36 (17,41-24,89)	19,50 (18,26-25,16)	0,7445
CD3 CTLA-4 ⁺	2,05 (1,36-3,81)	1,89 (1,31-5,13)	0,9655
CD4 HLA-DR ⁺	7,59 (4,75-12,23)	5,16 (4,08-6,66)	0,1219
CD4 CD25 ⁺	34,46 (29,87-36,24)	32,00 (28,13-33,68)	0,3685
CD4 CTLA-4 ⁺	1,97 (1,26-3,67)	1,66 (1,12-4,72)	0,9197
CD8 HLA-DR ⁺	28,56 (16,49-41,74)	21,72 (15,72-27,89)	0,3099
CD8 CD25 ⁺	2,63 (2,39-3,96)	3,42 (2,41-4,11)	0,4959
CD8 CTLA-4 ⁺	2,39 (1,52-3,82)	2,69 (1,62-5,77)	0,5951
Células/μL			
CD3 HLA-DR ⁺	239 (149-406)	157 (112-229)	0,1219
CD3 CD25 ⁺	264 (209-412)	268 (214-391)	0,8653
CD3 CTLA-4 ⁺	28 (18-55)	28 (18-78)	0,8294
CD4 HLA-DR ⁺	56 (42-119)	44 (32-71)	0,1257
CD4 CD25 ⁺	246 (203-398)	254 (200-357)	0,9652
CD4 CTLA-4 ⁺	15 (11-32)	16 (10-43)	0,9885
CD8 HLA-DR ⁺	142 (84-210)	104 (63-162)	0,1673
CD8 CD25 ⁺	16 (11-22)	15 (11-27)	0,6339
CD8 CTLA-4 ⁺	10 (6-28)	14 (7-29)	0,5933

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Perfil de maturação B

Em relação às duas classificações usadas na abordagem da maturação B, as mulheres GA DA apresentaram valores absolutos mais baixos da subpopulação Bm1 que as mulheres GA SDA. Deve salientar-se, contudo, que nas células Bm2' (de transição) se encontraram tendências, no limiar da significância estatística, para valores percentuais e absolutos mais elevados em mulheres do subgrupo GA DA (tabela 74).

No entanto, foi sobretudo com a classificação clássica IgD/CD27 que se reportaram mais diferenças estatisticamente significativas. Nomeadamente, as mulheres do subgrupo GA DA apresentaram valores percentuais mais elevados de células B de transição, mas as contagens absolutas de células B de memória e células B de memória não *switched* estavam mais baixas nestas mulheres, quando comparadas com as mulheres do subgrupo GA SDA (tabela 75).

Tabela 74 – Comparação do perfil maturativo B periférico, segundo a classificação Bm1-5, entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos B	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
Bm1	8,58 (4,80-13,33)	2,21 (7,19-16,69)	0,1202
Bm2	65,47 (58,51-74,63)	62,91 (58,92-69,15)	0,5409
Bm2'	5,74 (3,25-7,51)	2,32 (1,71- 4,14)	0,0558
Bm3+Bm4	1,91 (0,79-3,86)	1,41 (0,91-2,41)	0,6553
Bm5	4,45 (3,51-7,49)	6,49 (5,09-8,07)	0,2301
eBm5	8,85 (6,85-15,24)	9,91 (7,79-14,81)	0,6504
Células/μL			
Bm1	12 (7-24)	27 (14-40)	0,0316
Bm2	95 (70-141)	150 (93-177)	0,1965
Bm2'	8 (6-12)	5 (4-7)	0,0559
Bm3+Bm4	2 (1-6)	3 (2-4)	0,4021
Bm5	7 (5-11)	13 (6-21)	0,0912
eBm5	13 (7-25)	22 (14-25)	0,2902

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Tabela 75 – Comparação do perfil maturativo B periférico, segundo a classificação de IgD/CD27, entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos B	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
B naïve	64,48 (46,34-75,30)	57,32 (48,49-65,68)	0,4114
B memória	32,66 (22,75-48,49)	39,19 (31,47-48,27)	0,3626
B memória não <i>switched</i>	17,04 (14,69-22,82)	22,04 (16,99-31,90)	0,1688
B memória <i>switched</i>	13,27 (9,78-18,69)	14,08 (10,52-19,50)	0,8983
DN	2,23 (1,95-3,16)	3,05 (2,38-3,99)	0,1911
B de transição	4,27 (3,87-5,24)	2,25 (1,44-3,11)	0,0012
Plasmablastos	1,85 (0,93-3,15)	1,48 (1,15-2,60)	0,8975
Células/μL			
B naïve	93 (67-137)	124 (78-158)	0,3328
B memória	50 (36-66)	86 (50-128)	0,0432
B memória não <i>switched</i>	28 (21-42)	56 (29-69)	0,0292
B memória <i>switched</i>	23 (11-28)	30 (16-41)	0,1764
DN	4 (2-5)	7 (4-10)	0,0675
B de transição	7 (6-10)	5 (3-8)	0,2273
Plasmablastos	2 (2-6)	3 (3-5)	0,2188

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil, DN – Duplos negativos IgD⁺CD27⁻.

Células reguladoras

Ao nível dos perfis de células reguladoras T e B, apenas se identificou um parâmetro com diferença estatisticamente significativa na comparação entre mulheres do grupo GA com e sem intercorrências alérgicas na sua descendência. Trata-se da subpopulação de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}, que tal como as células B de transição já abordadas, se encontrava aumentada em mulheres do subgrupo GA DA (tabela 76).

Tabela 76 – Comparação das subpopulações de células T e B reguladoras, entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação Celular	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
Células T reguladoras			
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (%)	8,42 (6,54-10,04)	8,11 (7,28-8,70)	0,7018
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} CD127 ^{-dim} (Células/ μ L)	70 (50-88)	63 (52-84)	0,8969
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (%)	6,17 (5,70-7,05)	6,04 (4,54-7,93)	0,7879
CD4 ⁺ CD25 ^{Hi} Fox p3 ⁺ (Células/ μ L)	52 (43-65)	52 (42-63)	0,8519
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (%)	6,13 (4,77-6,87)	6,66 (5,50-7,59)	0,2785
CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi} (Células/ μ L)	49 (38-65)	58 (43-69)	0,4277
Expressão de Foxp3 em células T CD4 ^{Dim} CD25 ^{Hi}	1,57 (1,51-1,79)	1,65 (1,51-1,77)	0,9651
Células B reguladoras			
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (%)	21,31 (17,84-34,23)	28,61 (20,82-36,69)	0,2070
CD24 ^{Hi} CD27 ⁺ (Células/ μ L)	33 (22-58)	60 (37-103)	0,0635
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	2,74 (1,79-4,61)	1,58 (0,73-2,36)	0,0296
CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (Células/ μ L)	5 (3-8)	3 (2-6)	0,3099

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Citocinas e células produtoras de citocinas

Finalmente, não houve variações significativas nos parâmetros estudados no perfil citocínico, incluindo citocinas séricas, entre mulheres atópicas com e sem intercorrências alérgicas na sua descendência durante os primeiros seis meses de vida (tabelas 77 a 79).

Tabela 77 – Comparação de células T produtoras de IFN- γ e IL17, entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos B	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
CD4 IFN- γ ⁺ (Th1)	32,57 (22,93-45,49)	31,71 (21,30-42,23)	0,7018
CD4 IL17 ⁺ (Th17)	2,22 (1,96-2,61)	2,07 (1,76-2,59)	0,6355
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	1,15 (0,88-1,36)	1,16 (0,88-1,80)	0,6918
CD4 IFN- γ ⁺ total	33,58 (23,56-47,02)	33,26 (22,15-44,74)	0,7018
CD4 IL17 ⁺ total	3,56 (3,06-4,00)	3,45 (2,72-4,37)	0,9654
CD8 IFN- γ ⁺ (Th1)	56,07 (38,90-67,91)	49,02 (42,04-66,78)	0,6600
CD8 IL17 ⁺ (Th17)	0,67 (0,53-1,20)	0,91 (0,75-1,05)	0,4804
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	0,82 (0,53-1,30)	1,18 (0,80-1,64)	0,0813
CD8 IFN- γ ⁺ total	57,48 (40,12-68,34)	50,13 (43,77-68,36)	0,7879
CD8 IL17 ⁺ total	1,57 (1,19-2,23)	2,11 (1,67-2,61)	0,1765
Células/μL			
CD4 IFN- γ ⁺ (Tc1)	290 (207-367)	289 (183-350)	0,9214
CD4 IL17 ⁺ (Tc17)	18 (15-22)	19 (14-24)	> 0,9999
CD4 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	9 (7-13)	12 (7-16)	0,4965
CD4 IFN- γ ⁺ total	298 (217-376)	296 (191-365)	0,8070
CD4 IL17 ⁺ total	26 (24-34)	29 (22-41)	0,8971
CD8 IFN- γ ⁺ (Tc1)	236 (190-390)	247 (190-340)	0,9887
CD8 IL17 ⁺ (Tc17)	4 (3-6)	4 (3-6)	0,7518
CD8 IFN- γ ⁺ IL17 ⁺	3 (2-6)	5 (4-8)	0,1148
CD8 IFN- γ ⁺ total	239 (196-395)	251 (195-349)	0,9886
CD8 IL17 ⁺ total	7 (5-14)	10 (8-14)	0,3310

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Tabela 78 – Comparação de células T e B produtoras de IL10, entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Subpopulação de Linfócitos B	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
%			
CD3 IL10 ⁺	0,83 (0,61-1,18)	0,85 (0,71-1,45)	0,8070
CD4 IL10 ⁺	0,93 (0,77-1,35)	1,03 (0,83-1,68)	0,4604
CD8 IL10 ⁺	0,68 (0,30-1,16)	0,65 (0,37-0,92)	0,9431
CD19 IL10 ⁺	1,20 (0,90-1,84)	1,35 (1,02-1,61)	0,7772
Células/μL			
CD3 IL10 ⁺	14 (9-16)	14 (9-16)	0,8522
CD4 IL10 ⁺	10 (6-11)	11 (7-12)	0,5926
CD8 IL10 ⁺	4 (2-6)	3 (2-5)	0,7408
CD19 IL10 ⁺	2 (1-3)	3 (2-4)	0,1413

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05.

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Tabela 79 – Comparação das concentrações séricas de IL4 e IFN-γ entre os subgrupos de mulheres grávidas atópicas, com e sem intercorrências alérgicas na descendência.

Citocina	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Valor-p
IL4 (pg/mL)	0,3 (0,3-0,3)*	0,3 (0,3-0,8)*	> 0,9999
IFN (pg/mL)	15,8 (2,8-41,5)	7,6 (2,8-21,1)	0,2980

Mediana (Q1-Q3), Teste de Mann-Whitney U, valor-p significativo <0,05. * Resultados apresentados como mediana (mínimo; máximo).

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência, Q1 – 1º Quartil, Q3 – 3º Quartil.

Marcadores de Risco

Desde logo, na observação das características antropométricas e demográficas dos dois subgrupos de mulheres GA DA e GA SDA, foi possível identificar uma diferença entre os grupos no que se relaciona com o sexo do bebé. Assim, o sexo masculino da criança associou-se a um risco aumentado de manifestações atópicas aos seis meses de idade [*Odds ratio* (OR)= 10,0; Intervalo de Confiança [IC] 95%: 1,4-69,3; p=0,0361, teste exato de Fisher).

Da comparação efetuada entre mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, foi possível identificar parâmetros imunológicos com diferenças estatisticamente significativas entre ambos os subgrupos no terceiro trimestre da gravidez. Destacaram-se: a percentagem de células T (CD3⁺), a percentagem de células B (CD19⁺), a percentagem de células T CD8 de memória efetoras (CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻), a percentagem de células B de transição (CD19 IgM^{Hi}CD38^{Hi}), e a percentagem de células Breg CD24^{Hi}CD38^{Hi}. Para as contagens absolutas, encontraram-se diferenças estatisticamente significativas nas populações de células Bm1, B de memória e B de memória não *switched*.

A associação entre estes parâmetros e a ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA foi analisada. Através da utilização de curvas ROC (*Receiver operating characteristic*), foram estudados níveis de ponto de corte (*cut-off*) com melhor poder discriminativo para a potencial utilização destes parâmetros como marcadores preditivos de manifestações de risco para atopia até aos 6 meses de idade na descendência de mulheres atópicas.

Para a percentagem de linfócitos T, a curva ROC apresentou uma área de 0,782 [IC 95%: 0,597-0,967; $p=0,0207$] (figura 43).

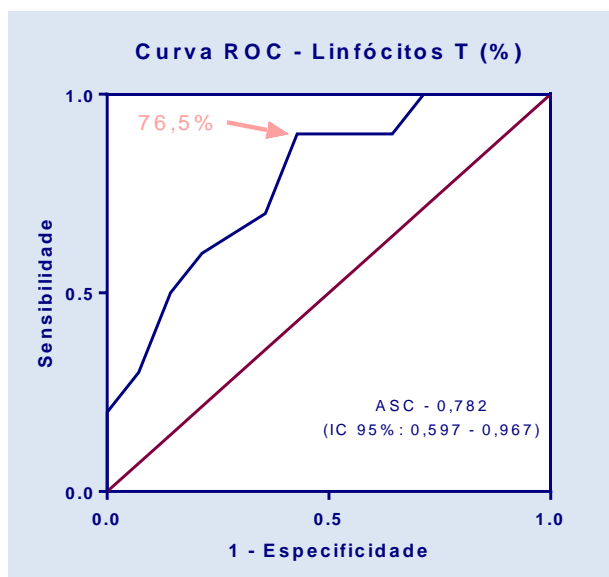


Figura 43 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos T (%), com indicação do respetivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 76,5% de linfócitos T, este parâmetro apresentou sensibilidade de 90,0% [IC 95%: 55,5-99,8], especificidade de 57,1% [IC 95%: 28,9-82,3], Valor preditivo positivo (VPP) de 60,0% [IC 95%: 32,3-83,7] e Valor preditivo negativo (VPN) de 88,9% [IC 95%: 51,8-99,7]. Com uma *Odds-Ratio* de 12,0 [IC 95%: 1,2-122,3; $p=0,0333$], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 12,0 vezes maior nas mulheres que têm valores acima de 76,5% de linfócitos T no terceiro trimestre de gravidez.

A aplicação deste critério (tabela 78) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores de linfócitos T $\geq 76,5\%$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA ($p=0,0333$; teste exato de Fisher).

Tabela 78 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* de 76,5% para o parâmetro Linfócitos T (%).

Linfócitos T (%)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\geq 76,5\%$	9	6	15
$< 76,5\%$	1	8	9
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Para a percentagem de linfócitos B, a curva ROC apresentou uma área de 0,771 [IC 95%: 0,577-0,966; p=0,0261], como representado na figura 44.

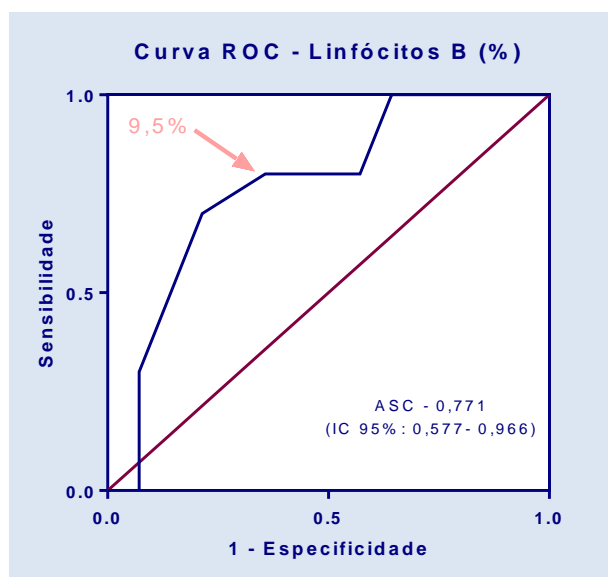


Figura 44 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos B (%), com indicação do respetivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 9,5% de linfócitos B, este parâmetro apresentou sensibilidade de 70,0% [IC 95%: 34,8-93,3], especificidade de 78,6% [IC 95%: 49,2-95,3], VPP de 70,0% [IC 95%:34,8-93,3] e VPN de 78,6% [IC 95%:49,2-95,3]. Com uma *Odds-Ratio* de 8,5 [IC 95%: 1,3-9,6; p=0,0351], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 8,5 vezes maior nas mulheres que têm valores abaixo de 9,5% de linfócitos B no terceiro trimestre de gravidez.

A aplicação deste critério (tabela 79) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores de linfócitos B $\leq 9,5\%$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA (p=0,0351; teste exato de Fisher).

Tabela 79 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* de 9,5% para o parâmetro Linfócitos B (%).

Linfócitos B (%)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\leq 9,5$	7	3	10
$> 9,5$	3	11	14
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

A figura 45 mostra a curva ROC para a percentagem de linfócitos T CD8 de memória efetores, que apresentou uma área de 0,743 [IC 95%: 0,541-0,945; $p=0,0465$].

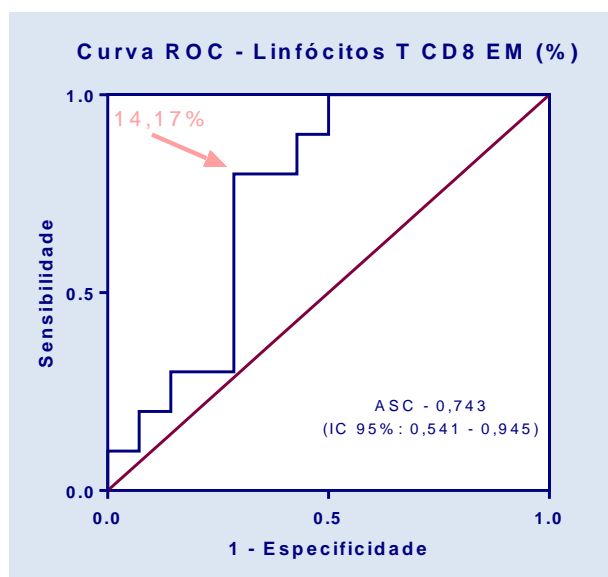


Figura 45 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos T CD8 de memória efetores (%), com indicação do respetivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, EM – células de memória efetoras, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - receiver operating characteristic.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 14,17% de linfócitos T CD8 de memória efetores, este parâmetro apresentou sensibilidade de 80,0% [IC 95%: 44,4-97,4], especificidade de 71,4% [IC 95%: 41,9-91,6], VPP de 66,7% [IC 95%: 34,9-90,1] e VPN de 83,3% [IC 95%: 51,6-97,9]. Com uma *Odds-Ratio* de 10,0 [IC 95%: 1,4-69,3; $p=0,0361$], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 10,0 vezes maior nas mulheres que têm valores abaixo de 14,17% de linfócitos T CD8 de memória efetores.

A aplicação deste critério (tabela 80) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores de linfócitos T CD8 de memória efetores $\leq 14,17\%$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA ($p=0,0361$; teste exato de Fisher).

Tabela 80 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* de 14,17% para o parâmetro Linfócitos T CD8 de memória efetores (%).

% Linfócitos T CD8 de memória efetores	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\leq 14,17$	8	4	12
$> 14,17$	2	10	12
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Para as contagens absolutas de linfócitos Bm1, como mostra a figura 46, a curva ROC apresentou uma área de 0,761 [IC 95%: 0,567-0,955; p=0,0326].

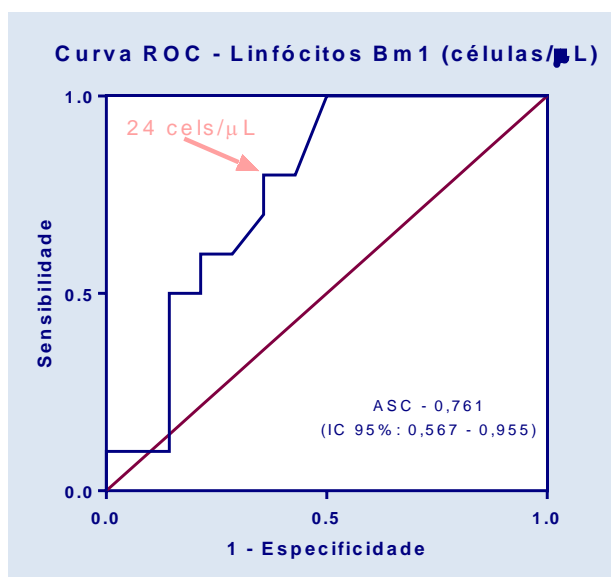


Figura 46 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos Bm1 (células/ μ L), com indicação do respectivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 24 células/ μ L de linfócitos Bm1, este parâmetro apresentou sensibilidade de 80,0% [IC 95%: 44,4-97,5], especificidade de 64,3% [IC 95%: 35,1-87,2], VPP de 61,5% [IC 95%: 31,6-86,1] e VPN de 81,8% [IC 95%: 48,2-97,7]. Com uma *Odds-Ratio* de 7,2 [IC 95%: 1,1-48,0; p=0,0472], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de GA é 7,2 vezes maior nas mulheres que têm valores abaixo de 24 células/ μ L de linfócitos Bm1.

A aplicação deste critério (tabela 81) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores absolutos de linfócitos Bm1 ≤ 24 e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA (p=0,0472; teste exato de Fisher).

Tabela 81 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* de 24 para o parâmetro Linfócitos Bm1 (células/ μ L).

Linfócitos Bm1 (células/ μ L)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
≤ 24	8	5	13
> 24	2	9	11
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Para a percentagem de linfócitos B de transição, a curva ROC apresentou uma área de 0,879 [IC 95%: 0,722-1,036; $p=0,0019$], como se representa na figura 47.

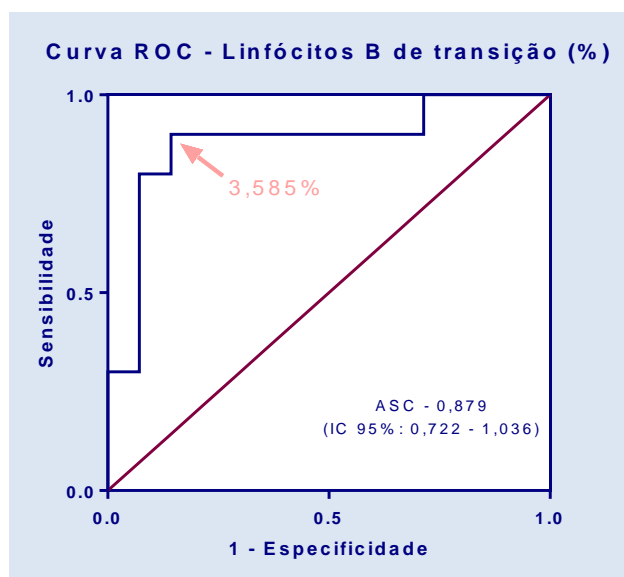


Figura 47 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos B de transição (%), com indicação do respetivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 3,585% de linfócitos B de transição, este parâmetro apresentou sensibilidade de 90,0% [IC 95%: 55,5-99,8], especificidade de 85,7% [IC 95%: 57,2-98,2], VPP de 81,8% [IC 95%: 48,2-97,7] e VPN de 92,3% [IC 95%: 64,0-99,8]. Com uma *Odds-Ratio* de 54,0 [IC 95%: 4,2-692,9; $p=0,0005$], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 54,0 vezes maior nas mulheres que têm valores acima de 3,585% de linfócitos B de transição.

A aplicação deste critério (tabela 82) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores de linfócitos B de transição $\geq 3,585\%$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA ($p=0,0005$; teste exato de Fisher).

Tabela 82 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* de 3,585% de Linfócitos B de transição (%).

Linfócitos B de transição (%)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\geq 3,585\%$	9	2	13
$< 3,585\%$	1	12	11
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Para as contagens absolutas de linfócitos B de memória, a curva ROC apresentou uma área de 0,746 [IC 95%: 0,550-0,943; $p=0,0434$], como se observa na figura 48.

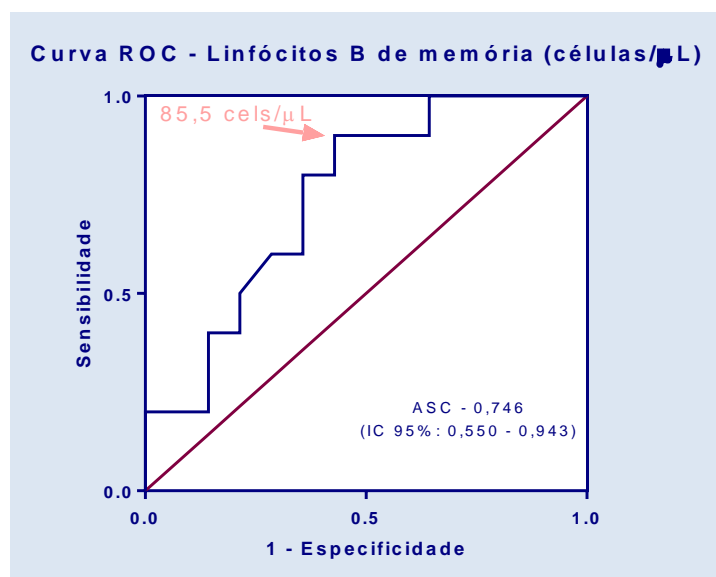


Figura 48 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos B de memória (células/ μ L), com indicação do respectivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 85,5 células/ μ L de linfócitos B de memória, este parâmetro apresentou sensibilidade de 90,0% [IC 95%: 55,5-99,8], especificidade de 57,1% [IC 95%: 28,9-82,3], VPP de 60,0% [IC 95%: 32,3-83,7] e VPN de 88,9% [IC 95%: 51,8-99,7]. Com uma *Odds-Ratio* de 12,0 [IC 95%: 1,2-122,3; $p=0,0333$], a chance de ocorrência manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 12,0 vezes maior nas mulheres que têm valores abaixo de 85,5 células/ μ L de linfócitos B de memória.

A aplicação deste critério (tabela 83) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores absolutos de linfócitos B de memória $\leq 85,5$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA ($p=0,0333$; teste exato de Fisher).

Tabela 83 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* 85,5 de Linfócitos B de memória (células/ μ L).

Linfócitos B de memória (células/ μ L)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\leq 85,5$	9	6	15
$> 85,5$	1	8	9
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Para as contagens absolutas de linfócitos B de memória não *switched*, a curva ROC apresentou uma área de 0,764 [IC 95%: 0,574-0,955; p= 0,0303], como mostra a figura 49.

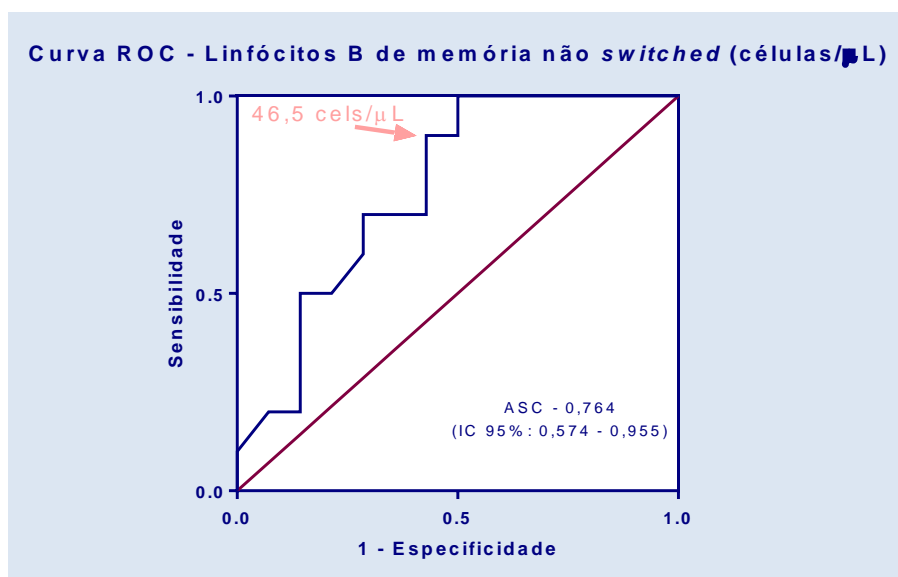


Figura 49 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos B de memória não *switched* (células/ μ L), com indicação do respectivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 46,5 células/ μ L de linfócitos B de memória não *switched*, este parâmetro apresentou sensibilidade de 90,0% [IC 95%: 55,5-99,8], especificidade de 57,1% [IC 95%: 28,9-82,3], VPP de 60,0% [IC 95%: 32,3-83,7] e VPN de 88,9% [IC 95%: 51,8-99,7]. Com uma *Odds-Ratio* de 12,0 [IC 95%: 1,2-122,3; p=0,0333], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA é 12,0 vezes maior nas mulheres que têm valores abaixo de 46,5 células/ μ L de linfócitos B de memória não *switched*.

A aplicação deste critério (tabela 84) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores absolutos de linfócitos B de memória $\leq 46,5$ células/ μ L e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA (p=0,0333; teste exato de Fisher).

Tabela 84 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* 46,5 de Linfócitos B de memória não *switched* (células/ μ L).

Linfócitos B de memória não <i>switched</i> (células/ μ L)	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\leq 46,5$	9	6	15
$> 46,5$	1	8	9
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

A figura 50 mostra, para a percentagem de linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi}, a curva ROC apresentou uma área de 0,764 [IC 95%: 0,572-0,957; p=0,0303].

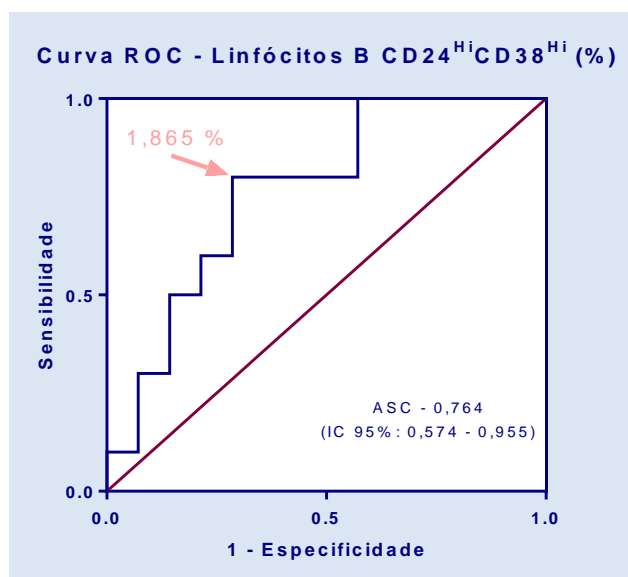


Figura 50 – Curva ROC para o parâmetro Linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi} (%), com indicação do respetivo ponto de corte (*cutoff*).

ASC – Área sob a curva, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, ROC - *receiver operating characteristic*.

Na distinção entre as mulheres dos subgrupos GA DA e GA SDA, com um valor de *cutoff* de 1,865% de linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi}, este parâmetro apresentou sensibilidade de 80,0% [IC 95%: 44,4-97,5], especificidade de 71,4% [IC 95%: 41,9-91,6], VPP de 66,7% [IC 95%: 34,9-90,1] e VPN de 83,3% [IC 95%: 51,6-97,9]. Com uma *Odds-Ratio* de 10,0 [IC 95%: 1,4-69,3; p=0,0361], a chance de ocorrência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres GA DA é 10,0 vezes maior nas mulheres que têm valores acima de 1,865% de linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi}.

A aplicação deste critério (tabela 85) permitiu identificar uma associação estatisticamente significativa entre valores absolutos de linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi} $\geq 1,865\%$ e a ocorrência de intercorrências alérgicas na descendência de mulheres GA (p=0,0361; teste exato de Fisher).

Tabela 85 – Tabela de contingência para análise de mulheres GA DA e GA SDA segundo o valor de *cutoff* 1,865% de Linfócitos B reguladores CD24^{Hi}CD38^{Hi} (%).

% Linfócitos B CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi}	GA DA (n=10)	GA SDA (n=14)	Total
$\geq 1,865$	8	4	12
$< 1,865$	2	10	12
Total	10	14	24

GA DA – Grávidas atópicas com intercorrências alérgicas na descendência, GA SDA – Grávidas atópicas sem intercorrências alérgicas na descendência.

Desta análise, foi possível identificar como marcadores preditivos, independentes, os oito parâmetros identificados com diferença estatisticamente significativa entre os grupos GA DA e GA SDA, no terceiro trimestre da gravidez. Com a OR mais elevada, e com melhores níveis de sensibilidade e especificidade, o parâmetro linfócitos B de transição (%) assume-se como o fator com melhor desempenho para prever o desenvolvimento de manifestações de risco para atopia até aos 6 meses de idade, na descendência de mulheres atópicas (tabela 86).

Tabela 86 – Fatores de risco associados ao desenvolvimento de manifestações de risco para atopia até aos 6 meses de idade, na descendência de mulheres atópicas.

Parâmetro imunológico de mulheres GA no 3.º trimestre de gravidez, [<i>cutoff</i>]	OR [IC 95%]	Valor-p
Linfócitos T (%), [76,5]	12,0 [1,2-122,3]	0,0333
Linfócitos B (%), [9,5]	8,5 [1,3-9,6]	0,0351
Linfócitos T CD8 EM (%), [14,17]	10,0 [1,4-69,3]	0,0361
Linfócitos Bm1 (células/ μ L), [24]	7,2 [1,1-48,0]	0,0472
Linfócitos B de transição (%), [3,585]	54,0 [4,2-692,9]	0,0005
Linfócitos B de memória (células/ μ L), [85,5]	12,0 [1,2-122,3]	0,0333
Linfócitos B de memória não <i>switched</i> (células/ μ L), [46,5]	12,0 [1,2-122,3]	0,0333
Linfócitos B reguladores CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%), [1,858]	10,0 [1,4-69,3]	0,0361

Teste de Fisher.

EM – células de memória efectoras, GA – Grávidas atópicas, IC 95% – Intervalo de confiança a 95%, OR – *Odds-ratio*.

Com o objectivo de perceber, de entre os marcadores de risco identificados, quais aqueles que de facto contribuem para explicar a presença/ausência de manifestações de risco para atopia na descendência de mulheres atópicas, foi aplicada a análise de regressão logística. O pressuposto de utilização desta análise prende-se com o facto de a variável resposta ser binária (0 para ausência de manifestações de risco para atopia e 1 para presença de manifestações de risco para atopia, em filhos de mães atópicas).

Tabela 87 – Coeficientes de regressão logística bivariada simples para avaliação de fatores preditivos associados ao desenvolvimento de manifestações de risco para atopia até aos 6 meses de idade, na descendência de mulheres atópicas.

Parâmetro imunológico de mulheres GA no 3.º trimestre de gravidez	Valor-p	B (beta)	Exp(B) [IC 95%]
Linfócitos T (%)	0,038	0,260	1,297 [1,014-1,659]
Linfócitos B (%)	0,053	-0,331	0,718 [0,513-1,005]
Linfócitos T CD8 EM (%)	0,045	-0,189	0,828 [0,0689-0,996]
Linfócitos Bm1 (células/ μ L)	0,055	-0,084	0,919 [0,843-1,002]
Linfócitos B de transição (%)	0,010	1,480	4,393 [1,416-13,626]
Linfócitos B de memória (células/ μ L)	0,065	-0,026	0,974 [0,948-1,002]
Linfócitos B de memória não <i>switched</i> (células/ μ L)	0,064	-0,049	0,953 [0,905-1,003]
Linfócitos B reguladores CD24 ^{Hi} CD38 ^{Hi} (%)	0,084	0,476	1,610 [0,937-2,767]

EM – células de memória efetoras, Exp – Exponencial, GA – Grávidas atópicas, IC – Intervalo de confiança a 95%, OR – *Odds-ratio*.

Após esta análise, salientaram-se apenas 3 parâmetros com associação significativa ao desenvolvimento de manifestações de risco para atopia em filhos de mães atópicas: Linfócitos T (%), Linfócitos T CD8 de memória efetores (%) e Linfócitos B de transição (%). Uma vez mais, é este último parâmetro aquele que se destaca em termos de significado estatístico,

Após a identificação dos parâmetros associados individualmente com o desenvolvimento de manifestações de risco para atopia em crianças filhas de mães atópicas, procedeu-se à tentativa de construção de um modelo de regressão logística bivariada, uma vez mais considerando que a variável resposta é binária (0 para ausência de manifestações de risco para atopia e 1 para presença de manifestações de risco para atopia, em filhos de mães atópicas), para avaliar quais as variáveis que seriam de facto importantes para explicar a atopia em crianças, filhas de mães atópicas.

Foram encontradas algumas limitações na construção do modelo de regressão logística, nomeadamente a interferência que certas variáveis têm sobre as outras, uma vez que se apresentam subpopulações e a respetiva população mãe, o que levou a uma nova abordagem na construção destes modelos e que será apresentada em trabalho futuro.

5. Discussão

5.1 Considerações Iniciais

Este trabalho pretendeu abordar o sistema imunitário materno de forma a enriquecer a sua caracterização desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério. Para além da exploração de perfis celulares e citocínicos maternos (nos quais se incluiu sobretudo a avaliação de diferentes populações de células T e B, com funções efectoras e reguladoras), foi também considerada a sua eventual relação com o desenvolvimento de atopia nas crianças. Realce-se que este estudo prima pelo seu pioneirismo, já que pela primeira vez foi acompanhado o compartimento B circulante em mulheres com asma e rinite alérgica desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério.

O estudo abrangeu quatro grupos de mulheres: grávidas atópicas (GA), não grávidas atópicas (NGA), grávidas saudáveis (GS) e não grávidas saudáveis (NGS). Os grupos de mulheres não grávidas foram avaliados apenas uma vez (NGA e NGS). Nas mulheres grávidas, o estudo incluiu a sua avaliação desde o terceiro trimestre da gravidez até ao fim do puerpério, ao qual se seguiu o acompanhamento das crianças até aos 6 meses de idade.

5.2 População do estudo

A principal dificuldade antevista para este projeto foi a capacidade de adesão das participantes grávidas recrutadas. De facto, enquanto para os grupos de mulheres não grávidas a sua participação implicou apenas uma avaliação, para as mulheres grávidas foram necessários cerca de 9 a 12 meses de acompanhamento, com seguimento até aos primeiros seis meses de vida do bebé. Contudo, a taxa de adesão foi elevada, e o ponto mais crítico de participação ocorreu no momento do parto (T2). Ainda assim, apesar da considerável imprevisibilidade temporal do parto, foi possível avaliar um número significativo de mulheres (19/24 no grupo de mulheres GA e 42/43 no grupo de mulheres GS), graças ao empenho dos clínicos e dos elementos do laboratório, que colaboraram para a elevada taxa de recuperação obtida. Esta orquestração entre os diferentes elementos garantiu a avaliação das amostras em tempo útil (24 a 48 horas após o parto), independentemente da hora e dia do parto.

A ocorrência do parto num hospital distinto daquele onde o estudo foi aprovado, foi um fator preponderante para a perda de amostras nesta avaliação. Este fator condicionou a análise das diferentes avaliações temporais dos grupos de grávidas, considerando as limitações do teste não paramétrico de Friedman para a análise de dados emparelhados, quando existem valores em falta. De forma a poderem ser incluídas na comparação todas as mulheres grávidas atópicas e grávidas saudáveis incluídas no estudo, o teste não paramétrico de Wilcoxon (*signed-ranks*) foi aplicado para a comparação longitudinal dos parâmetros imunológicos considerando as avaliações da gravidez e do fim do puerpério, tendo-se cingido a comparação dos grupos no parto à comparação de grávidas atópicas e grávidas saudáveis.

Ao nível da caracterização antropométrica e demográfica para os quatro grupos do estudo, há a salientar variações ao nível da paridade e dos valores de pressão sistólica e diastólica, em especial no grupo de mulheres NGS, mas não condicionando alterações significativas nos parâmetros imunológicos estudados. Acresce ainda que os valores de pressão sistólica e pressão diastólica se encontraram dentro do intervalo de normalidade em qualquer dos grupos.

Quanto ao índice de massa corporal (IMC), como expectável, os grupos de mulheres grávidas apresentaram valores superiores aos observados em mulheres não grávidas. Porém, a homogeneidade da população em estudo para as restantes características, na comparação de mulheres dos grupos GA e GS, e na comparação de mulheres dos grupos GA e NGA, são pontos a salientar.

As recomendações para a utilização de terapêutica na gravidez são perentórias, de forma a evitar a ocorrência de exacerbações que coloquem em risco mãe e feto (399, 472, 502, 503). Em termos de desenho do estudo, idealmente deveriam incluir-se mulheres asmáticas sem terapêutica, de modo a evitar os possíveis efeitos da medicação sobre os parâmetros imunológicos a avaliar. Mas, se por um lado, não traduziria a realidade clínica, a possível suspensão da terapêutica usual para inclusão no estudo constituiria, per si, uma abnegação dos princípios éticos no que concerne a abordagem clínica da mulher grávida asmática. Deste modo, e ainda que no grupo das mulheres não grávidas fosse exequível a suspensão terapêutica durante algumas semanas, previamente à inclusão no estudo, optou-se pela não suspensão da mesma, de modo a mimetizar a metodologia empregue na avaliação das mulheres grávidas.

Ao nível da avaliação das mulheres com asma, há ainda uma limitação a considerar, uma vez mais relacionada com o contexto da gravidez. Isto é, atualmente, um dos elementos importantes na avaliação do controlo da asma são as provas de função respiratória, que não foram efetuadas neste trabalho uma vez que não seria possível a sua realização em mulheres grávidas durante o terceiro trimestre. Em todo o caso, o controlo da asma, e a avaliação da rinite, foram efetuados com base nos restantes critérios da literatura atual (396, 399) pelo Imunoalergologista que acompanhou as mulheres com asma alérgica recrutadas (grupos GA e NGA). Esta última observação constitui aliás um ponto forte deste trabalho, uma vez que limita o enviesamento de vários observadores e critérios distintos no acompanhamento das mulheres, do ponto de vista da avaliação das doenças atópicas. Também ao nível da abordagem laboratorial se tentou limitar o mais possível os vieses de múltiplos operadores, tendo os ensaios sido realizados com os mesmos protocolos laboratoriais, estabelecidos e efetuados apenas por duas pessoas, e sempre com a supervisão, verificação e análise dos resultados pela responsável do laboratório (Catarina Martins).

Na abordagem das mulheres grávidas atópicas com e sem patologia alérgica na descendência, apesar da aparente homogeneidade de características antropométricas e demográficas, encontram-se dois pontos a salientar: índices de massa corporal mais elevados, após o puerpério, nas mulheres sem intercorrências alérgicas na descendência, e uma maior percentagem de crianças do sexo masculino no subgrupo de mulheres com clínica de sibilância recorrente e/ou eczema na descendência. Na avaliação das manifestações atópicas observou-se uma maior frequência de sintomas respiratórios do que de eczema. A observação da existência de clínica em crianças do sexo masculino parece ir de encontro ao normalmente descrito na literatura (418-421, 504-506). Ainda mais, considerando a ocorrência de manifestações respiratórias mais frequente nas crianças do sexo masculino, que apresentam menor calibre brônquico, em relação a crianças do sexo feminino (507).

No que diz respeito ao IMC, apesar de só se encontrar significado estatístico após o puerpério, a tendência para valores mais elevados nas mulheres sem intercorrências alérgicas na

descendência foi observada já durante a gravidez. A literatura contudo parece mostrar uma associação positiva entre peso materno e manifestações de atopia na descendência (508-510), o que não se verificou neste estudo. Ainda assim, não conhecendo os valores de IMC pré-gravestação, não se pode inferir se os valores mais elevados de IMC nas mulheres com intercorrências alérgicas na descendência são intrínsecos, ou se, neste caso, foram de alguma forma condicionados pela gravidez.

A análise dos dados recolhidos nos inquéritos realizados às participantes permitiu perceber que cerca de 40% das mulheres do grupo GA pararam a terapêutica durante o puerpério. Quando inquiridas acerca desta paragem, referiram não ser mais premente proteger o filho, mesmo na presença de sintomas. Por outro lado, a entrada de mais um membro na família foi igualmente indicada como causa de disrupção de rotinas.

Considerando as características distintivas da avaliação após o puerpério no que respeita aos perfis imunológicos, procurou-se avaliar se a terapêutica poderia ser o elemento responsável pelas variações observadas. Na comparação dos parâmetros imunológicos estudados no período após o puerpério, em GA com e sem terapêutica, não se verificaram alterações relevantes entre os dois grupos. Conclui-se assim que as modificações observadas no período pós-parto são independentes da terapêutica.

Finalmente, 3 mulheres do grupo GA relataram agravamento clínico das doenças de base (asma e rinite alérgicas) durante o puerpério, encontrando-se duas destas mulheres sob terapêutica. Não se verificou em nenhuma destas doentes qualquer traço distintivo das restantes em relação aos parâmetros imunológicos estudados.

Da exploração de dados demográficos, outra observação importante a ressaltar é a de que não foram observadas diferenças relevantes na comparação dos parâmetros imunológicos entre mulheres do grupo GA com e sem exacerbação da asma / sintomas nasais durante a gravidez ou durante o puerpério. Concluindo, a influência das limitações referidas parece desprezável para os resultados e as conclusões deste estudo.

Foram abordados nesta comparação outros elementos importantes, associados muitas vezes com o risco para a atopia (418-421, 504-506), como o mês do nascimento, o peso à nascença, a história familiar de atopia, a amamentação ou a frequência de infantário, mas não se verificaram diferenças entre os grupos para estes parâmetros.

5.3 Parâmetros imunológicos – caracterização geral

Esta caracterização, que se estendeu, de modo particular, às populações celulares T e B com funções reguladoras, permitiu explorar e aprofundar o conhecimento do sistema imunitário da grávida com asma e rinite alérgica. Mais ainda, uma vez que se recrutaram apenas mulheres com asma controlada, também o conhecimento do perfil imunológico nestas mulheres poderá ser importante para o reconhecimento de marcadores de exacerbação de asma na gravidez. Considerando, por fim, o importante impacto que a modulação materna terá no desenvolvimento do sistema imunitário da descendência, este estudo tem potencial aplicação, na descrição de marcadores preditivos para o desenvolvimento de atopia na descendência de mulheres com asma e rinite alérgica.

Para ir de encontro aos objetivos deste trabalho, foram sobretudo avaliadas diferentes subpopulações celulares de leucócitos, mas sobretudo de linfócitos, caracterizadas nas mulheres recrutadas para o estudo, juntamente com alguns mediadores imunológicos. Inicialmente foram identificadas variações ao nível das diferentes populações celulares em mulheres do grupo NGA, quando comparadas com mulheres do grupo NGS, de forma a delinear o perfil imunológico de mulheres com asma e rinite alérgica, controladas e sob terapêutica.

Numa abordagem integrada, encontramos na mulher não grávida asmática, controlada e sob terapêutica, contagens celulares mais elevadas para a generalidade das populações leucocitárias e linfocitárias. Destaca-se ainda uma maior presença de eosinófilos nas mulheres do grupo NGA, o que era expectável, tendo em conta a importância desta população celular no contexto das doenças alérgicas (511). Na observação de cada compartimento *per si*, encontrámos nos linfócitos T de mulheres NGA, um perfil maturativo com o componente de células de memória mais rico em células efetoras e efetoras terminais, em relação às mulheres do grupo NGS. Curiosamente, a expressão de CTLA-4 está também diminuída nas mulheres do grupo NGA. O compartimento B assume igualmente importantes diferenças, sobretudo ao nível da presença de mais células com fenótipo de memória, em detrimento de células de transição, mas sobretudo de plasmablastos. Para os perfis de regulação, temos uma maior percentagem de células Treg e de células T produtoras de IL10 após estimulação, bem como uma maior expressão de Foxp3 nestas células, em mulheres NGA. Por fim, verifica-se ainda a diminuição dos níveis séricos de IFN- γ nestas mulheres.

Portanto, um perfil mais rico em células T e B de memória, com mais células T reguladoras e menos IFN- γ caracteriza as mulheres do grupo NGA, com asma controlada e sob terapêutica.

Da observação deste perfil característico, partiu-se para a comparação de mulheres com asma e rinite alérgica no contexto da gravidez. De forma semelhante ao que acontece em mulheres saudáveis, a gravidez é um evento que altera de forma significativa o perfil imune na mulher com asma e rinite alérgica. Em relação às mulheres NGA, verificou-se nas mulheres GA, durante o terceiro trimestre da gravidez, uma alteração substancial da fórmula leucocitária, com um importante incremento de neutrófilos em termos relativos e absolutos, e consequentemente, com diminuição dos valores das restantes populações leucocitárias. Esta alteração dos leucócitos circulantes aconteceu de forma semelhante ao que se observou na comparação entre os grupos NGS e GS. A diminuição nas contagens de linfócitos totais estendeu-se a grande parte das subpopulações linfocitárias caracterizadas nas mulheres do grupo GA. No compartimento T foi ainda possível observar variações ao nível das populações de memória, com a diminuição da presença de células de memória efetoras e efetoras terminais nos linfócitos T CD4, e com mais células de memória central, e menos células de memória efetoras terminais presentes nos linfócitos T CD8. Em comparação com o grupo NGA, o compartimento B, desde logo menos representado nas mulheres do grupo GA (à imagem do que se observou na comparação entre os grupos GS e NGS), apresentou igualmente diminuição das populações de memória, com um aumento de células naïve e plasmablastos. Apesar de não haver alteração nos compartimentos Treg entre os grupos GA e NGA, há uma menor expressão de Foxp3 em mulheres GA e ainda uma menor percentagem de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} circulantes. Uma vez mais, as alterações verificadas em mulheres do grupo GA (comparativamente a mulheres NGA) são semelhantes ao observado na comparação entre os grupos GS e NGS. Finalmente, há a reportar uma diminuição

relativa das células T CD4 produtoras de IFN- γ em mulheres do grupo GA, e uma maior presença de células T CD8 produtoras de IL17, em relação a mulheres do grupo atópicas não grávidas.

É interessante notar que, apesar das várias diferenças que se apontam entre os grupos NGA e NGS, há na gravidez uma grande aproximação do perfil imune entre as mulheres dos grupos GA e GS. A salientar, entre mulheres GA e GS no terceiro trimestre da gravidez, apenas se reportaram valores mais elevados de eosinófilos, de células B de transição, e células B produtoras de IL10 em GA. Acrescente-se ainda a maior expressão de Foxp3 nas células Treg, bem como a presença de mais células T polifuncionais e produtoras de IL17, e por outro lado níveis séricos mais baixos de IFN- γ , observados nas mulheres GA.

Em suma, a gravidez tem impacto no perfil imune de mulheres com asma e rinite alérgica, promovendo a presença de neutrófilos circulantes, com diminuição dos compartimentos T e B de memória, e diminuição de expressão de Foxp3. As alterações do perfil imunológico que decorrem durante a gravidez em mulheres GA, tornam estas mulheres mais próximas de grávidas saudáveis, mantendo-se no entanto pequenas diferenças entre elas.

A evolução da gravidez até ao fim do puerpério representa para a mulher GA uma recuperação da fórmula leucocitária, com diminuição das populações de neutrófilos e a compensatória subida de linfócitos, basófilos e eosinófilos. A subida das contagens absolutas de linfócitos tem, na generalidade, repercussão nas respetivas subpopulações celulares na avaliação final. Nesta fase, para o compartimento T verifica-se sobretudo uma elevação quantitativa das populações de memória efectoras e efectoras terminais, com perda de células naïve e de células de memória central, sobretudo nas células T CD8. Após o puerpério, verifica-se nas células B uma alteração da subpopulação de células de transição, cuja quantidade sobe, neste período, de forma significativa. Estas modulações das populações T e B da gravidez ao fim do puerpério parecem ocorrer de forma paralela nos grupos de mulheres GA e GS. No fim do puerpério, em mulheres GA (e GS), verifica-se uma maior expressão de Foxp3 nas células Treg e o aumento da produção de IFN- γ pelas células T circulantes. Ainda assim, não há variação significativa dos níveis séricos de IFN- γ desde a gravidez até ao fim do puerpério, em qualquer dos grupos, apesar de se observar uma tendência para valores mais elevados no período pós-parto.

Se por um lado, após o puerpério, as mulheres do grupo GA parecem manter-se próximas das mulheres do grupo GS do ponto de vista do perfil imunológico (variações ligeiras em populações de memória e a manutenção de menor concentração sérica de IFN- γ), há também neste período um processo de reaproximação das mulheres do grupo GA em relação a mulheres do grupo NGA, sobretudo no que diz respeito ao compartimento T. Não obstante, a ocorrência de contagens absolutas de linfócitos mais baixas nas mulheres GA após o puerpério, que se traduzem em algumas subpopulações celulares, é particularmente evidente no compartimento B circulante, que apresenta maior diferença na comparação entre os grupos GA e NGA. Assim, destaca-se o aumento de populações de células B de transição e plasmablastos nas mulheres do grupo GA. Uma alteração aliás, que também é observada na comparação entre o grupo NGS e o grupo GS após o puerpério.

Pelo exposto pode inferir-se que após a gravidez há alguma reversão das alterações imunológicas impostas durante a gestação. No entanto, no fim do puerpério, onde parece ocorrer já alguma normalização, mantêm-se alterações características sobretudo no compartimento B.

Tendo em conta que em ambos os grupos NGA e NGS se encontravam múltiparas em número considerável, as alterações observadas no puerpério nos grupos GA e GS (quando comparadas respetivamente com NGA e NGS) tenderão a normalizar com o tempo. No entanto, estudos com acompanhamento de grávidas por períodos mais longos permitirão compreender até quando se prolongam as alterações impostas no período gestacional e perinatal, bem como os fatores que poderão condicionar esta normalização.

Com as particularidades deste estudo no que se refere à terapêutica instituída nas mulheres com asma e rinite alérgica, é forçoso abordar este ponto na discussão. A maioria dos estudos que versam os efeitos dos agentes terapêuticos usados nas mulheres recrutadas para este trabalho (corticosteroides inalados - ICS, agonistas beta2 de ação prolongada - LABA, antileucotrienos) não relatam efeitos sistémicos sobre células do sistema imunitário, com exceção dos corticosteroides orais sistémicos, ou da utilização de altas doses de ICS (>800 µg/dia de budesonida ou fluticasona) associados a LABA (215, 512-515). Nenhuma destas opções foi porém utilizada nas mulheres que participaram no presente estudo. Ainda segundo a literatura, especialmente os ICS, podem ter impacto em doentes com asma, no que diz respeito a avaliações funcionais (516). Mais se acrescenta que todas as mulheres GA e NGA suspenderam a utilização de LABA nas 48 horas que antecederam as avaliações programadas, e que não se observaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição entre grupos de mulheres atópicas quanto à terapêutica (LABA/Antileucotrienos), estando todas sob ICS (fluticasona ≤320 µg/dia, ou equivalente).

Tendo em conta a limitação do teste de Friedman para a análise de dados emparelhados quando há valores em falta (o que aconteceu em ambos os grupos de GA e GS no timepoint 2 – parto), teriam de ser eliminados desta análise 5 conjuntos de dados emparelhados no grupo GA (5 mulheres) e 1 no grupo GS (1 mulher). Este ponto condicionou a avaliação do timepoint do parto. Ainda assim, a avaliação do parto não registou alterações entre mulheres do grupo GS e mulheres do grupo GA, exceto no que se refere aos níveis séricos de IFN-γ. Uma vez que se mantiveram no parto, de um modo geral, as observações verificadas no terceiro trimestre de gravidez entre mulheres GA e mulheres GS, optou-se por valorizar sobretudo a flutuação dos parâmetros imunes entre a primeira e a última avaliações (T1 e T3). Desta forma, puderam ser incluídas na comparação todas as mulheres GA e GS incluídas no estudo, e ao mesmo tempo foram aprofundadas as variações mais marcadas em cada mulher, que se observaram exatamente neste estudo, entre estes dois momentos – terceiro trimestre da gravidez (T1) e fim do puerpério (T3).

5.4 O compartimento T

A importância das células T CD4 na patogénese da asma e de outras condições alérgicas é amplamente reconhecida, já que o paradigma da atopia assenta na diferenciação preferencial de células Th2, que orquestram este tipo de respostas. Assim, será sobretudo o compartimento de células T CD4 de memória o responsável pelo *pool* de células Th2, apesar de se reconhecer

cada vez mais a importância das células T CD8 no estabelecimento de perfis de resposta, considerando a sua importante capacidade secretora (102). A inflamação alérgica na asma crónica parece assentar num aumento de células T de memória ativadas, presentes na circulação e sobretudo ao nível do pulmão (517), que inclusive têm vindo a ser relacionadas com o agravamento das manifestações da doença (518).

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, percebe-se, nas mulheres NGA, um padrão característico no compartimento de células de memória, quer em células T CD4, quer em células T CD8. Isto é, a população mais evidente dentro das células T CD4 e dentro das células T CD8 é, de facto, a população de células naïve, em mulheres dos grupos NGA e NGS. Contudo, as mulheres do grupo NGA apresentam uma maior diferenciação de células de memória efectoras, e sobretudo de células de memória efectoras terminais. Em contrapartida, as células de memória central surgem diminuídas em mulheres do grupo NGA, em comparação com controlos saudáveis. Não se verificaram, porém, alterações ao nível da expressão de marcadores de ativação (CD25 e HLA-DR), nas mulheres do grupo NGA, ainda que estas mulheres tenham apresentado menos células com expressão de CTLA-4, em relação a mulheres do grupo NGS.

Alguns estudos mostraram alterações no compartimento T de memória em doentes com asma atópica, no entanto os resultados nem sempre foram consistentes (517-521). Em particular para a asma, os dados de Antunez e colaboradores (519) não relataram diferenças estatisticamente significativas nas populações de células T de memória entre doentes com asma atópica e controlos saudáveis. Machura e colaboradores (517) parecem apontar diferenças entre os compartimentos de células de memória T CD4 e T CD8 em crianças com asma. Em relação a controlos saudáveis, estas crianças apresentaram diminuição de células de memória nos linfócitos T CD4, mas um ligeiro aumento de células de memória nos linfócitos T CD8. Outros trabalhos (518, 521) vão no sentido contrário, relatando um compartimento de memória aumentado ao nível das células T CD4, em doentes asmáticos, sem diferenças no que respeita às células T CD8. Foi inclusivamente proposta uma relação positiva entre níveis elevados de células de memória e o agravamento da condição asmática (518). Na mucosa nasal de doentes com rinite alérgica, apesar de as células T de memória serem à partida a população leucocitária mais prevalente, ainda que em quantidades comparáveis às observadas em controlos saudáveis, os seus valores tornaram-se ainda mais elevados na época polínica (522).

Com uma estrutura semelhante à do presente estudo, o trabalho de Bohacs e colaboradores (334) abordou igualmente a presença em circulação de células T CD4 naïve e memória, observando em mulheres não grávidas asmáticas um aumento do compartimento de células de memória, com diminuição do compartimento de células naïve, em relação as mulheres grávidas não asmáticas.

É de salientar que estes estudos, de um modo geral, se basearam apenas na expressão de CD45RA e CD45RO para a caracterização das populações de células naïve e de memória, o que limita a discriminação subsequente das restantes subpopulações. Mais ainda, é conhecido que as células T de memória efectoras terminais voltam a expressar CD45RA (523), tal como as células naïve, o que pode condicionar as conclusões retiradas destes estudos. Ora, a combinação de marcadores CD45RA/CD62L usada no trabalho que se discute nesta dissertação, evidencia uma maior capacidade de discriminar, sobretudo dentro das células T de memória, outras

subpopulações. Assim, os resultados obtidos parecem completar as observações de estudos anteriores, eventualmente ajudando a esclarecer alguma da disparidade encontrada.

Recordando o aumento do compartimento de células T CD4 de memória relatado por Bohacs e colaboradores (334) em mulheres não grávidas asmáticas, segundo os dados agora expostos, parece existir antes uma alteração diferencial nas diferentes subpopulações de células T de memória nestas mulheres. Assim, há uma diminuição no *pool* de células T de memória central (na população T CD4 e na população T CD8) em mulheres do grupo NGA. Porém, em relação a controlos saudáveis, estas mulheres mostraram um aumento das populações de células T de memória efetoras e efetoras terminais. Considerando as disparidades funcionais destas subpopulações de células T de memória (21, 524), encontrar-se-á, nas mulheres do grupo NGA, uma maior presença de células com efetiva capacidade funcional ao nível da produção de citocinas e da função citotóxica.

Há ainda um ponto a não esquecer na discussão destes dados em relação a estudos anteriores, que se prende com a idade dos indivíduos analisados. Muitos dos estudos reportam-se a idade pediátrica, e o compartimento T varia de forma importante de acordo com a faixa etária dos indivíduos. Ou seja, em condições normais, a criança tem um predomínio de células T naïve, enquanto no adulto a razão naïve/memória diminui consideravelmente nas células T (525).

Em relação às mulheres do grupo GA, é interessante verificar que a gravidez atenua a projeção dos compartimentos periféricos de linfócitos T de memória efetores e efetores terminais. Esta alteração poderá acontecer, exatamente em resposta aos mecanismos de imunorregulação e tolerância impostos durante a gestação, que desta forma limitam a presença de células com maior potencial inflamatório. Encontram-se resultados semelhantes na literatura, onde se observam percentagens de células T CD4 de memória mais baixas em mulheres asmáticas, durante a gravidez, comparadas com mulheres asmáticas não grávidas (334).

A concorrer para que esta alteração do compartimento T circulante seja um efeito promovido pelo ambiente imunorregulador da gravidez, verificamos que, na comparação entre os grupos GA e GS, não se encontrou alteração no perfil maturativo de células T CD4 e T CD8 durante o terceiro trimestre de gestação. Porém, após o puerpério, volta a encontrar-se uma maior presença de células T de memória efetoras terminais (CD4 e CD8) nas mulheres GA, que assumem, nesta altura, um compartimento T semelhante ao das mulheres NGA. Mais ainda, tanto nas mulheres do grupo GA como nas mulheres do grupo GS, na comparação emparelhada das avaliações (gravidez e puerpério), verificou-se uma subida nas respetivas subpopulações de células T CD4 e T CD8 com fenótipo de memória efetoras, sendo contudo esta variação mais expressiva em mulheres asmáticas.

A utilização dos marcadores HLA-DR e CD25 na avaliação do ativação do compartimento T tem sido amplamente considerada no contexto da asma e das doenças atópicas (517, 519, 526-528). Contudo, há evidências de que as células que expressam HLA-DR não são exatamente as mesmas que expressam CD25, ainda que a sua coexpressão possa ser encontrada em células de memória, curiosamente aumentadas em doentes asmáticos (527). Na literatura, relacionada com esta expressão diferencial ou não, a verdade é que se encontram, uma vez mais, resultados contraditórios. Por exemplo, em crianças com asma alérgica foram já descritos valores aumentados e diminuídos para a percentagem de células T ativadas (517, 519).

Ainda assim, a ativação das células T parece ser reconhecida na literatura como um elemento importante para a asma alérgica (521, 529). Em amostras de lavados broncoalveolares de doentes com asma alérgica, foi reportada uma presença mais efetiva de células T ativadas, sobretudo em indivíduos sintomáticos (530). Estes autores assinalaram mesmo a existência de uma associação entre a presença de linfócitos T CD4 ativados nestas amostras e a acumulação de eosinófilos, a hiperreatividade brônquica e os sintomas da doença. A ativação T parece ser igualmente um elemento importante para a rinite alérgica (531).

Nas mulheres do grupo NGA, não se verificaram alterações nos níveis de expressão de CD25 ou HLA-DR em qualquer das subpopulações T analisadas, em relação às mulheres do grupo NGS. Porém, tal como foi reportado na literatura (214), encontrou-se sim um aumento nos valores absolutos das subpopulações de células T ativadas em mulheres não grávidas com asma e rinite alérgica, quando comparadas com mulheres NGS. De facto, além das variações nos valores absolutos, dependentes sobretudo das oscilações das respetivas populações-mãe, nas subpopulações de células T ativadas não se observaram diferenças relevantes entre os grupos de mulheres estudados.

Uma possível explicação para níveis de ativação T semelhantes em mulheres asmáticas e não asmáticas pode ser a utilização de ICS. Como já foi referido, as mulheres asmáticas incluídas neste estudo estavam a ser tratadas com ICS, e estes fármacos têm exatamente efeitos sobre a ativação das células T. A comprová-lo, encontram-se evidências da redução de marcadores de ativação em células T circulantes e das vias aéreas, de doentes asmáticos tratados com corticosteroides (532-534). Em consonância, no estudo de Gemou-Engesaeth e colaboradores (521), as percentagens de células T CD4 e T CD8 circulantes a expressar HLA-DR ou CD25 estavam aumentadas em doentes asmáticos em relação a controlos saudáveis, mas esta situação reverteu-se com a introdução de ICS *de novo*, ou com aumento da dose usada.

Na literatura há algumas abordagens da ativação T no contexto da gravidez. Numa população de mulheres kuwaitianas reportaram-se contudo valores mais elevados de células T ativadas, nomeadamente células T CD4 e T CD8 CD25⁺ e células T CD8 HLA-DR⁺ no terceiro trimestre da gravidez (535). No trabalho de Ostensen e colaboradores (341), em mulheres saudáveis, os níveis de células T com expressão de CD25 e com expressão de HLA-DR não mostraram diferir entre mulheres não grávidas e mulheres grávidas no terceiro trimestre, com exceção da população T CD4 HLA-DR⁺, tal como se verificou na atual comparação entre os grupos GS e NGS.

O mesmo estudo de Ostensen (341), seguindo as mulheres grávidas até um *timepoint* idêntico ao aqui observado no período pós-parto (6 semanas após o parto), reportou aumentos significativos das populações de células T ativadas, CD25⁺ e HLA-DR⁺ no fim do puerpério, quer em relação a mulheres não grávidas, quer em relação ao terceiro trimestre da gravidez. Tal não se verificou, no presente estudo, em mulheres do grupo GA. Nas mulheres do grupo GS, em relação ao terceiro trimestre da gravidez, houve, no pós-parto, aumentos ligeiros nas populações T DR⁺, mas diminuições nas populações CD25⁺. Entretanto, ainda que considerando um diferente período pós-parto (apenas uma semana depois do parto), um outro estudo em mulheres saudáveis, não encontrou diferenças nas células T CD25⁺ entre mulheres não grávidas e mulheres grávidas em diferentes tempos da gestação e no período pós-parto. Os autores

descreveram todavia, um aumento nas células T HLA-DR⁺ ao longo da gestação, com uma descida significativa no pós-parto (536).

Toda esta variabilidade à volta das populações de células T ativadas sugere, desde logo, a necessidade de mais estudos a acompanhar a evolução destas populações, que tenham em especial atenção os vários fatores que podem condicionar a ativação celular, como processos inflamatórios ou infecciosos, que ocorram durante as avaliações.

Em relação às populações de células T a expressar CTLA-4, apenas se encontraram diferenças na comparação entre os grupos NGA e NGS, estando estas células diminuídas no primeiro grupo. Pode especular-se que na gravidez se diluirá esta diminuição em mulheres asmáticas, uma vez que até ao fim do puerpério as mulheres do grupo GA não mostraram diferenças nem em relação a mulheres do grupo GS, nem em relação a mulheres do grupo NGA. Ainda assim, em relação ao terceiro trimestre da gravidez, no pós-parto, verificou-se, para todas as subpopulações T a expressar CTLA-4, uma tendência não significativa para valores inferiores.

O CTLA-4 é uma molécula rapidamente expressa após ativação da célula T, que compete com o CD28 pela ligação à célula APC (494). Em linha com o observado no presente estudo, tem sido sugerido, um defeito constitutivo na expressão de CTLA-4 em doentes com asma e rinite alérgica, uma vez que se observou a diminuição da população T CTLA-4⁺ quer em circulação quer no esputo induzido destes doentes (531, 537). Curiosamente, foi identificado, como fator de risco para a asma, um polimorfismo no gene do CTLA-4 (538).

É importante não esquecer que esta molécula desempenha também importantes funções na célula Treg, nomeadamente na sua capacidade supressora (539). Desta forma, o aparente defeito intrínseco da molécula CTLA-4 em asmáticos pode estar na génese da inflamação asmática, através da limitação das células Treg e da sua diferenciação (531). Um efeito que poderá, contudo, ser ultrapassado pela terapêutica no que respeita às células Treg (482, 540).

5.5 O compartimento B

Durante muito tempo, as células B reduziram-se na Imunologia a meras células produtoras de anticorpos. A paleta de funções desta população celular tem vindo contudo a ganhar novas tonalidades, à medida que vários estudos vão reportando distintas subpopulações e fenótipos para as células B, com funções muitas vezes paralelas à produção de anticorpos (119, 145). As doenças autoimunes são paradigmáticas nesta nova era das células B, com a contribuição das células B a assumir funções que ultrapassam largamente a produção de anticorpos na patogénese destas doenças (541). Em várias doenças autoimunes, as alterações características do compartimento B em circulação e nos órgãos linfoides secundários têm sido inclusivamente propostas como ferramentas de diagnóstico, e parecem ser promissoras para a geração de novos biomarcadores de doença (para diagnóstico, prognóstico ou avaliação de resposta à terapêutica) (212, 542, 543). No contexto das doenças infecciosas surgem evidências de que a alteração do compartimento linfocitário B circulante (onde se identificam subpopulações celulares ausentes em indivíduos não infetados), se possa relacionar com respostas imunes anómalas ou deficitárias, como já se reportou no contexto da infeção pelo VIH (544).

Com este trabalho, também se deu um pequeno contributo para a caracterização do compartimento B no contexto das doenças atópicas, reconhecendo-se nas mulheres NGA uma importante alteração do compartimento B, em comparação com mulheres NGS.

Resultados contraditórios têm sido apresentados para a caracterização de subpopulações linfocitárias em doentes com asma (545-547). Neste trabalho, partindo de uma linfocitose basal, as mulheres do grupo NGA apresentaram um aumento dos valores absolutos de células B (e na generalidade, das suas respetivas subpopulações). Contagens mais elevadas de células B foram já reportadas na literatura exatamente em mulheres asmáticas não grávidas (214) e crianças com atopia (215). Na literatura, as terapêuticas associadas ao tratamento quer da asma, quer da atopia (ICS, LABA e anti-histamínicos) não apresentaram efeitos consistentes sobre estes parâmetros (215, 548), pelo que podemos considerar, neste caso, que a linfocitose B observada não é um efeito da terapêutica instituída em NGA.

A abordagem do compartimento B circulante foi feita com duas estratégias paralelas: na primeira avaliaram-se as populações B de acordo com a expressão de IgD, CD27, IgM e CD38 classicamente apontadas na literatura; depois foi igualmente aplicada a classificação ontogénica Bm1-5, muito utilizada nas abordagens das doenças autoimunes. Este trabalho é o primeiro a aplicar esta classificação em doentes asmáticos. Apesar de identificarem subpopulações B correlacionadas, e de um modo geral evidenciarem resultados concordantes, a classificação Bm1-5 mostrou um maior potencial para a discriminação de diferenças entre as subpopulações B avaliadas.

A classificação clássica apenas evidenciou diferenças entre os grupos de mulheres NGA e NGS nas percentagens de células B DN e de plasmablastos, com as mulheres do grupo NGA a apresentar valores mais baixos. Vários autores têm debatido a origem e o significado biológico da população B DN (IgD⁺CD27⁻): alguns consideram que esta pertence a uma linhagem distinta de células B de memória, com eventual diferenciação independente do centro germinativo (CG), outros que é um progenitor da célula B de memória CD27⁺; ou ainda uma população B de memória senescente, que perde a expressão de CD27 (495, 549, 550). Na realidade, as células B DN representam uma população heterogénea, já que expressam diferentes marcadores de ativação, como o CD38 (presente de forma fraca ou mesmo ausente nestas células), o CD21 ou o CD95 (551). Esta população foi descrita como estando aumentada em doentes com lúpus eritematoso sistémico, nos quais se correlacionou com a atividade da doença (495, 549). Recentemente, Berkowska e colaboradores (222) descreveram a presença de duas subpopulações de células B de memória IgE⁺ em doentes atópicos e não atópicos: uma CD27⁺ e outra CD27⁻. O limitado grau de hipermutação somática observado nas células B de memória CD27⁺IgE⁺, e a sua existência em doentes com deficiência em CD40L, parece apontar para a diferenciação destas células por uma via que não depende do CG (222). Apesar de no presente estudo não ter sido avaliada a expressão de IgE, e por isso mesmo não se poder estimar a percentagem de células B DN com expressão de IgE, foi demonstrada uma diminuição da subpopulação B DN. Em estudos futuros será importante caracterizar a expressão de imunoglobulinas de superfície nas células B DN, mas também outros marcadores de ativação, para melhor ilustrar esta população de doentes com asma atópica. Além disso, considerando que na artrite reumatoide as células B DN estão aumentadas na circulação, mas a sua frequência diminui em resposta a tocilizumab (anticorpo monoclonal contra o recetor da IL6),

particularmente as células B DN IgA⁺ (552), a avaliação das células B DN na asma (considerando também a expressão de IgE) pode ajudar a estabelecer biomarcadores para o controlo da doença e bem como da eficácia da terapêutica.

A utilização da classificação mais detalhada Bm1-5 mostrou igualmente uma menor presença de plasmablastos (Bm3+Bm4), mas também reconheceu mais diferenças entre os grupos de mulheres NGA e NGS. Assim, embora a maior subpopulação B em ambos os grupos seja a população de células B naïve (Bm2), em mulheres do grupo NGA, as células de memória Bm1 (incluindo a população Bm1 CD27⁺) e Bm5 encontram-se aumentadas, em detrimento das células de transição (Bm2') e plasmablastos.

A IgE é um elemento crucial nas respostas alérgicas, no entanto, as células B circulantes IgE⁺ apresentam-se em números substancialmente inferiores aos das células B que expressam outros isótipos (553), o que dificulta a sua avaliação. Recentes avanços nas tecnologias de análise celular mostraram-se capazes de acompanhar de forma eficiente a diferenciação IgE, apresentando evidências de que é possível uma diferenciação clássica via centro germinativo para as células B IgE⁺ (219-221). No entanto, têm surgido resultados, sobretudo em modelos animais, que suportam que as células B de memória IgE⁺ e os plasmócitos de vida longa secretores de IgE se possam diferenciar num processo de troca de isótipo sequencial, de modo particular, a partir de células B de memória IgG1⁺ (219-221). Estes dados fazem-nos olhar sob uma nova perspetiva para as células B na asma atópica. Os resultados do presente estudo, com um compartimento de memória mais efetivo nas mulheres NGA, sugerem a sua potencial relação com a existência de sensibilização a alérgenos nestas doentes. O aumento das subpopulações de memória observado pode ter origem numa maior presença de células B de memória específicas de alérgenos (IgE⁺, mas principalmente IgE⁻), promovidas quer por processos de sensibilização sistémica quer por eventos de sensibilização nas mucosas, como se observa em doentes com rinite alérgica (553).

O BAFF (*B-cell activating factor*), elemento importante para a diferenciação e ativação B, tem sido positivamente correlacionado com o aumento dos compartimentos de células B de memória, e inversamente correlacionado com as subpopulações de células B imaturas/naïve (554). Níveis elevados de BAFF têm sido descritos quer em doentes com rinite alérgica (218) quer em doentes com asma (217). Deste modo, pode também sugerir-se que o desequilíbrio observado nas subpopulações B de mulheres NGA possa estar relacionado com os níveis de BAFF observados em doentes com atopia.

É importante também comentar a redução observada nos plasmócitos circulantes em mulheres NGA, que foi inclusive corroborada pelas duas classificações usadas. Embora bem representados nos órgãos linfoides secundários, os plasmablastos são residuais na circulação periférica, uma vez que a sua orientação será seguir para os tecidos-alvo e sobretudo para a medula óssea, onde irão diferenciar-se em plasmócitos (555, 556). As células produtoras de anticorpos respondem de forma rápida e específica à exposição a um antígeno, pelo que aumentam em circulação cerca de 2 a 4 dias após o contacto (551), diminuindo drasticamente cerca de 14 dias após a exposição ao antígeno (557). No presente estudo, a diminuição da presença de plasmablastos em circulação pode corroborar uma diferenciação preferencial para célula B de memória em mulheres com asma controlada. Assim, a atividade da doença pode estar relacionada com este

perfil de diminuição de plasmablastos circulantes, como anteriormente proposto para doentes com artrite reumatoide (558). É interessante constatar que, num modelo animal de asma alérgica, tanto a sensibilização sistémica como a sensibilização por inalação de alérgénio parecem capazes de induzir, na medula óssea, plasmócitos de longa vida, específicos para o alérgénio, que não só segregam IgE, mas também IgG e IgA (223). Ora, estes dados sugerem que, após o contacto com o alérgénio, seja montada uma resposta específica orientada no sentido da diferenciação de plasmócitos. Por outro lado, a diferenciação de plasmócitos produtores de IgE pode acontecer a partir de outras células B IgG⁺ específicas de alérgénio, que serão responsáveis pela produção de anticorpos IgE de alta afinidade, quer na medula óssea, quer nas mucosas nasal e brônquica. A diminuição de plasmablastos em circulação pode expor também um padrão de migração diferencial destas células na asma alérgica e na rinite alérgica, com um recrutamento preferencial de plasmablastos para os órgãos-alvo (553). Uma vez mais, partindo de observações em modelo animal de asma, parecem existir evidências da migração das células B para o pulmão (559). Em outras patologias nas quais se encontra igualmente alteração da resposta humoral, foram também relatados perfis de *homing* distintos, com diminuição dos níveis de plasmablastos em circulação (558, 560). Pode assim concluir-se que são necessários mais estudos abordando em especial os órgãos-alvo das patologias alérgicas, particularmente com estratégias capazes de monitorizar os processos de migração e recrutamento celular, para que possam ser integrados os resultados agora observados em mulheres NGA. No entanto, segundo o recente trabalho de Drake e colaboradores (226), a presença de células B parece ser necessária para que aconteçam respostas imunes Th2, bem como a inflamação das vias aéreas. Por tudo isto, tanto os padrões de diferenciação como os padrões de migração das células B poderão ser alvo de futuras abordagens terapêuticas, já que os doentes com asma e rinite alérgica apresentam características distintivas neste compartimento celular.

A gravidez vem redistribuir as cartas do jogo no compartimento B em mulheres asmáticas, à imagem do que faz em mulheres saudáveis. Na grávida, asmática ou não, há uma diminuição das contagens absolutas de células B totais (e respetivas subpopulações), que não deriva apenas da diminuição observada nos linfócitos totais, já que também as percentagens de linfócitos B se encontram diminuídas. A linfopénia B associada à gravidez foi já relatada em modelo animal (332). Vários eventos podem contribuir para a diminuição de células B na fase final da gravidez. Em modelos animais observa-se uma extensa migração de células B para o útero, entre outras células do sistema imunitário como os monócitos, nas fases mais tardias da gestação, sobretudo promovida por uma alteração no padrão de expressão de quimiocinas (561). Em simultâneo, o estradiol, uma hormona associada à gravidez, que atinge o seu pico de concentração no terceiro trimestre, tem sido igualmente apontado como um elemento relevante na modulação de células B (562-564). A IL7 é uma importante citocina de sobrevivência para os linfócitos. O gene desta citocina parece responder à ação do estrogénio, que o regula negativamente. Na gravidez, a linfopoiese B é reduzida por diminuição da disponibilidade de IL7 (565). A partir das observações do presente estudo, pode inferir-se que esta limitação durante a gravidez acontece igualmente em mulheres asmáticas, nas quais se observa uma linfopénia B.

De facto, parece que o ambiente único de gravidez de alguma forma se sobrepõe aos efeitos da asma e rinite alérgicas sobre o compartimento B circulante. Comparando os grupos de mulheres GS e NGS, e os grupos de mulheres GA e NGA, observa-se nas mulheres grávidas um compartimento B naíve significativamente mais acentuado (em relação às outras

subpopulações). Mesmo dentro das subpopulações de memória, as células B de memória *switched* (IgD⁻) parecem estar diminuídas durante a gravidez (comparando GS vs NGS, e GA vs NGA). A expansão de células B maduras (IgD⁺) e células B MZ foi anteriormente reportada na gravidez em ratinho (332). Este potencial mecanismo de compensação do compartimento B para ultrapassar a diminuição da produção na medula óssea, que como vimos se observa durante a gestação, garantirá a proteção da mulher grávida neste período. Ao mesmo tempo, a progesterona, outra hormona que atinge o seu pico nas últimas semanas de gestação, inibe diretamente a ativação das células B em ratinho (566), o que pode também explicar a acumulação de células B maduras, não ativadas, durante a gravidez.

Quanto aos plasmablastos, estas células parecem recuperar os níveis circulantes em mulheres do grupo GA durante a gravidez, quando comparados com valores observados em mulheres do grupo NGA. Este resultado pode estar relacionado com uma limitação nas capacidades de migração destas células para os tecidos durante a gravidez. Eventualmente, a recuperação dos plasmablastos também poderá dever-se a um aumento da expressão de CD138, um marcador típico desta linhagem, aumento este mediado por células do estroma do endométrio durante a gravidez (566). Curiosamente, mesmo após o puerpério, as mulheres GA continuam a evidenciar percentagens de plasmablastos circulantes mais elevadas do que as observadas em mulheres do grupo NGA, o que sugere um outro mecanismo, transversal à gravidez e ao puerpério, na génese desta alteração.

O puerpério permite, de acordo com as observações deste estudo, que se proceda a alguma recuperação no compartimento B, que no fim desta fase esta já a reaproximar-se do observado em mulheres não grávidas. No entanto, é importante salientar que há uma alteração característica neste ponto, assumida quer em mulheres do grupo GA quer em mulheres do grupo GS, isto é, a recuperação das células B de transição, que atingem neste ponto níveis mais elevados em relação aos verificados na gravidez, mas também níveis mais elevados em relação aos grupos de mulheres não grávidas. Tendo em conta o que foi exposto atrás acerca da limitação imposta à linfopoiese B durante a gravidez, será talvez a quebra nesse mecanismo de regulação que promoverá a renovação da capacidade medular para a diferenciação da linhagem B. Ao nível sistémico, esta renovação irá assim traduzir-se na maior presença de células de transição, o estadio maturativo em que grande parte das células B abandona a medula óssea em direção à circulação periférica.

Considerando que as exacerbações da asma podem ocorrer durante a gravidez, o acompanhamento do compartimento B circulante, ao longo deste período, em mulheres com asma alérgica, poderá ajudar a compreender se as subpopulações B flutuam ou não com as manifestações da doença e, se assim acontecer, este poderá ser um elemento importante a utilizar na predição de exacerbações asmáticas. Isto é, considerando a descrição de um perfil B característico para a doença controlada, a sua alteração poderá ajudar a antever o desenvolvimento de uma agudização alérgica.

5.6 As células T reguladoras

As células Treg são uma população heterogénea, o que levanta alguns problemas na sua abordagem do ponto de vista metodológico. Diferentes estratégias de imunofenotipagem podem ser utilizadas, o que poderá fazer variar os resultados de acordo com o fenótipo

selecionado para a avaliação, condicionando as conclusões, por vezes contraditórias, encontradas na literatura (359). Como forma de ultrapassar esta limitação na abordagem das células Treg, neste estudo foram utilizadas três estratégias de análise para a sua caracterização: células T $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$, células T $CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ e células T $CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$. Ao nível deste compartimento, este estudo apresentou, para as populações caracterizadas, sobretudo alterações relacionadas com a gravidez.

Após a sua identificação em humanos (567), a caracterização das células Treg em diversas condições fisiológicas e patológicas tem enriquecido a literatura no campo da Imunologia. Particularmente na realidade da gravidez, quer no modelo animal, quer no humano, estas células parecem aumentar no início da gestação, diminuindo progressivamente ao longo da segunda metade do período gestacional (aproximadamente a partir do meio do segundo trimestre) (336, 568). Tal como reportamos no presente estudo, outros autores relataram que as mulheres grávidas durante o terceiro trimestre evidenciam percentagens de células Treg semelhantes às observadas em mulheres não-grávidas (336, 569). Os nossos resultados também estão parcialmente de acordo com o estudo publicado por Wegienka e colaboradores (570), que relatou o aumento progressivo das percentagens de células Treg desde o período pré-natal até aos primeiros 12 meses após o parto, quer em mulheres atópicas quer em mulheres não-atópicas. Tal como reportado por estes autores, também no presente trabalho foi possível verificar nas mulheres dos grupos GS e GA valores mais elevados de células Treg (população $CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$) após o puerpério (6 semanas após o parto), em comparação com os valores observados em mulheres não grávidas, apesar das diferenças na calendarização das avaliações entre ambos os estudos. Contudo, na avaliação emparelhada dentro de cada grupo de mulheres grávidas, esta diferença não foi estatisticamente significativa, o que poderá exatamente relacionar-se com a janela temporal considerada na avaliação pós-parto, em relação ao trabalho de Wegienka e colaboradores. Surpreendentemente, estas variações não se evidenciaram nas restantes subpopulações de células Treg analisadas neste estudo ($CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ e $CD4^{Dim}CD25^{Hi}$). É de salientar, neste caso, estudos recentes em mulheres grávidas, que sustentam que a abordagem $CD4^{+}CD25^{Hi}CD127^{-/dim}$ subestima amplamente a população $Foxp3^{+}$ dentro das células T $CD4$ (569). Esta poderá ser uma possível explicação para a discrepância observada. Uma vez mais se sublinha que diferentes estratégias para identificação celular, avaliação de períodos gestacionais distintos ou o confronto com modelos animais, que apresentam diferenças importante em relação à gravidez humana (modulação distinta do sistema endócrino, e diferentes períodos de gestação) (339) são também possíveis vieses na interpretação destes estudos (340).

Regressando agora à abordagem das mulheres com asma e rinite alérgica, os resultados deste trabalho parecem apontar para um aumento dos valores percentuais de células Treg em mulheres com asma e rinite alérgica, controlada e sob terapêutica, em relação as mulheres não grávidas saudáveis ($CD4^{Dim}CD25^{Hi}$ e $CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$). Esta observação estende-se igualmente aos valores reportados em mulheres do grupo GA após o puerpério. De facto, outros estudos relataram igualmente um aumento das células Treg circulantes em crianças asmáticas sob terapêutica com ICS, em comparação com controlos não-asmáticos, emparelhados para a idade (571, 572). No entanto, no estudo de Bohacs e colaboradores (334), os autores descreveram níveis de células Treg $CD4^{+}CD25^{Hi}Foxp3^{+}$ comparáveis entre mulheres não grávidas saudáveis e mulheres asmáticas (grávidas e não grávidas), ainda que as mulheres asmáticas tenham

apresentado uma tendência para valores mais elevados. Estes autores relataram ainda valores semelhantes de células Treg entre doentes asmáticos com e sem terapêutica regular com ICS. Em linha com este resultado, no presente estudo, foram igualmente observados valores similares de células Treg entre GA com e sem terapêutica após o puerpério. Considerando que durante a gravidez todas as mulheres GA estiveram sob terapêutica com ICS, estes resultados apontam para que o impacto dos ICS na frequência de células Treg em circulação possa ser sustentado após interrupção do tratamento, ainda que de forma transitória. Em doentes com asma alérgica foram já estudadas amostras de lavados broncoalveolares, nos quais se avaliaram populações de células Treg Foxp3⁺. Nestas amostras, verificou-se uma menor presença de células Treg, e ainda a sua limitação do ponto de vista funcional. Estes achados foram contudo revertidos com introdução de terapêutica com ICS (540). Em conclusão, parece haver ainda muito para explorar acerca dos efeitos dos ICS nas células Treg, particularmente na asma.

À data, pensa-se que um efeito concreto dos ICS nas células Treg, seja exatamente a capacidade de induzir um aumento na expressão de Foxp3. No estudo de Karagiannidis e colaboradores (482), doentes asmáticos tratados com ICS apresentaram valores significativamente mais elevados de expressão Foxp3 do que controlos saudáveis. Todavia, segundo Provoost e colaboradores (204), a expressão de Foxp3 encontra-se aumentada em asmáticos tratados com ICS, em comparação com asmáticos não tratados, mas não em comparação com controlos saudáveis. As diferenças metodológicas usadas nos dois estudos podem estar na base da disparidade entre os resultados. Os resultados deste trabalho parecem ir de acordo às observações de Karagiannidis (482): não só se verificaram em mulheres do grupo NGA níveis de expressão de Foxp3 superiores aos observados em mulheres do grupo NGS, como também, durante a gravidez, as mulheres GA mostraram ter uma expressão aumentada do fator de transcrição das células Treg, em comparação com mulheres do grupo GS.

Olhando mais aprofundadamente para o terceiro trimestre da gravidez, encontra-se uma importante diminuição na expressão de Foxp3 em ambos os grupos de mulheres grávidas (GA e GS). Recentemente, foi identificada a expressão de recetores de progesterona em células Treg (573), o que pode suportar o potencial imunomodulador das hormonas da gravidez, também ao nível das células Treg. Assume-se aqui como limitação do presente estudo o facto de não terem sido efetuados doseamentos hormonais.

Na realidade, sem comprometer o potencial regulador das células Treg durante a gravidez, e até mesmo promovendo a sua proliferação(574) e as suas proporções (337), tem sido sugerido que a progesterona e o 17β-estradiol possam reduzir a expressão Foxp3 em células Treg em mulheres grávidas no segundo trimestre de gestação (575). Também à luz destas considerações se podem ler os resultados deste trabalho. Isto é, na linha da redução da expressão de Foxp3 observada por outros autores no segundo trimestre de gestação (575), as observações do trabalho atual parecem estender essa redução na expressão de Foxp3 até ao terceiro trimestre. Mais ainda, o presente estudo ostenta evidências de que, em mulheres do grupo GA com asma controlada, tratadas com ICS, também se verifica esta diminuição de expressão de Foxp3, característica da gravidez, ainda que os níveis de expressão do fator de transcrição se mantenham mais elevados em mulheres GA do que em mulheres GS.

O nível de expressão de Foxp3 pode ser considerado como um marcador da funcionalidade das células Treg. No entanto, não foram efetuadas neste estudo outras aproximações para a avaliação funcional da célula Treg. Ainda assim, considerando que as mulheres GA incluídas no estudo apresentaram asma controlada, e que as células T reguladoras têm um papel protetor em relação ao agravamento da asma (576), estes dados parecem ser a favor de uma função normal das células Treg nestas mulheres. Depois de puerpério, os níveis de expressão Foxp3 normalizam, isto é, regressam a valores próximos dos respetivos controlos (mulheres dos grupos NGS e NGA), o que reforça a ideia de modulação da expressão de Foxp3 induzida pelo ambiente da gravidez.

É certo que a avaliação da expressão de Foxp3 apenas por citometria de fluxo pode ser uma potencial limitação do estudo, principalmente tendo em conta as limitações técnicas relacionadas com as variações do equipamento ao longo do tempo. Mas, por outro lado, esta análise de expressão numa população classicamente caracterizada como Treg, com recurso a marcadores específicos, pode superar esta limitação. Além disso, a utilização de métodos de normalização com base na literatura técnica (501), pode igualmente concorrer para limitar a variabilidade, permitindo uma abordagem válida para avaliação da expressão deste marcador por citometria de fluxo.

5.7 As células B reguladoras e o perfil citocínico regulador

O papel importante que as células reguladoras apresentam no controlo dos mecanismos de tolerância e inflamação alarga-se agora às células B. Este estudo é pioneiro a nível internacional também na monitorização de subpopulações de células B com funções de regulação no âmbito da gravidez em mulheres com asma e rinite alérgica. A falta de um fenótipo de consenso para estas células levou a que se impusesse uma abordagem múltipla, à imagem do que se promoveu para os linfócitos Treg. Aqui, porém, a disparidade das populações consideradas como tendo funções reguladoras é ainda mais agravada, pelo que se torna mais plausível a ocorrência de resultados díspares, como aliás já se tem observado na literatura (236).

Contudo, com a caracterização das subpopulações de células B CD24^{Hi}CD27⁺ e CD24^{Hi}CD38^{Hi}, não se encontram diferenças entre os grupos NGA e NGS, a não ser o aumento dos respetivos valores absolutos, que continuam a espelhar os níveis elevados de linfócitos, incluindo linfócitos B, observados no grupo de mulheres NGA. No entanto, parece haver modulação destas subpopulações na gravidez. Concretamente, no terceiro trimestre de gravidez encontra-se uma diminuição das células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}, com um aumento importante no período pós-parto, quer em mulheres do grupo GA, quer em mulheres do grupo GS.

As funções reguladoras das células B são um evento recente na história da Imunologia (142), e talvez por isso não haja ainda um consenso no que se refere ao seu fenótipo, nem no humano, nem no ratinho, onde foram inicialmente descritas (145, 229). No humano, sobretudo as subpopulações de células B CD24^{Hi}CD27⁺ e CD24^{Hi}CD38^{Hi} têm sido apontadas como tendo funções reguladoras, funções essas que se encontram intimamente ligadas à sua capacidade de secretar IL10 (236, 577). Em doentes com rinite alérgica e em doentes com rinite e asma alérgicas, as frequências de células Breg CD24^{Hi}CD27⁺ (236, 238) mostraram-se diminuídas, mas foi reportado um aumento nas populações de células Breg CD24^{Hi}CD38^{Hi} em doentes asmáticos sem qualquer terapêutica instituída (236). Não se verificaram no presente estudo diferenças

entre os grupos NGA e NGS. Contudo, ao contrário dos estudos já efetuados neste contexto, as mulheres do grupo NGA aqui recrutadas encontravam-se sob terapêutica à data da sua avaliação. Como já se referenciou para as células Treg (572), os nossos dados sugerem que o efeito benéfico da terapêutica (por exemplo dos ICS) no curso das doenças alérgicas, como a asma ou a rinite, passe pela normalização, induzida pela terapêutica, das subpopulações de células Breg nos doentes tratados.

É curioso perceber que as células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} se encontram moduladas pela gravidez. A diminuição desta subpopulação celular durante a gravidez, tendo em conta que estas células se incluem também nas células B de transição, imaturas, corrobora as observações já referidas durante a gravidez no compartimento B (332). Ou seja, a limitação da linfopoiese B durante a gravidez, estará na origem desta diminuição periférica de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} (565). No entanto, os valores observados no terceiro trimestre da gravidez são ultrapassados de forma importante após puerpério, para níveis significativamente mais elevados do que aqueles observados nos grupos de controlo com mulheres não grávidas (grupos NGA e NGS). Esta situação representará portanto a recuperação do sistema imunitário materno após o desafio gestacional. Uma vez mais há a considerar algumas abordagens imuno-endócrinas nestes processos. Por exemplo, no ratinho, as células B de transição expressam níveis elevados de recetores de prolactina, e eventos de hiperprolactinemia parecem promover o aumento de células B de transição circulantes, mas não de células B maduras (578). A resposta mediada por prolactina pode, portanto, explicar a acumulação de células B de transição após o puerpério, um período em que os níveis desta hormona aumentam até 30 vezes, em comparação com os níveis prévios à gravidez (579).

Tem sido defendido que, em indivíduos saudáveis, um dos mecanismos pelos quais a célula B CD24^{Hi}CD38^{Hi} atua é através da promoção da diferenciação de células T CD4 Foxp3⁺ (577). Deste modo, admite-se que o aumento das células Treg após o puerpério (em mulheres GA e GS), também reportado por outros autores (570), possa ser mediado pelas células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}. Dados experimentais revelaram igualmente que as células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} promovem a expressão de Foxp3 em células T CD4, quando em co-cultura (577). Uma vez mais fazendo o paralelismo com as restantes observações deste trabalho, é perceptível que a expressão de Foxp3 nas células Treg e a subpopulação de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} evoluam de forma semelhante desde a gravidez até ao fim do puerpério. Mais ainda, há uma correlação positiva entre os dois parâmetros nas mulheres saudáveis, o que também reforça a ideia de as células B modularem as células Treg.

Olhando agora para a mulher com asma e rinite alérgica, os perfis das células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} e da expressão de Foxp3 são comparáveis nos grupos GA e GS, o que corrobora a ideia, nestes elementos concretos, de um padrão modulado pela gravidez, independente quer das terapêuticas, quer da existência de asma e rinite alérgica. Posto isto, a maior frequência de sintomas associados à asma, incluindo exacerbações asmáticas, no fim do segundo trimestre e no terceiro trimestre de gravidez em mulheres asmáticas grávidas (323, 580), poderá exatamente estabelecer-se em consequência, ou em relação com a diminuição observada nas células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} durante este período.

Não é demais salientar a importância de mediadores imunológicos, como as citocinas, nos mecanismos de regulação do sistema imunitário. Em particular para as respostas orquestradas pelas células Treg e Breg, a IL10 parece ser a citocina reguladora por excelência, a par com o fator de transformação do crescimento (TGF)- β .

Para a IL10, estudos ao longo da gravidez demonstraram níveis semelhantes de produção desta citocina por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) entre o período inicial e final da gestação (581). No entanto, segundo Rolle e colaboradores, no início da gravidez, a capacidade de secreção de IL10 pelas células B encontra-se aumentada, em função dos elevados níveis de gonadotrofina coriônica humana (β HCG) observados nas fases iniciais da gestação, que são promotores das células Breg do ponto de vista da frequência, mas também da função (333). No terceiro trimestre da gravidez, os níveis desta hormona diminuem significativamente, o que pode limitar os seus efeitos nas células Breg, assumindo-se assim mais uma via que conduzirá uma gravidez normal a um parto normal. Estas observações poderão explicar os níveis semelhantes de células B secretoras de IL10, mas também de células T, observados entre os grupos GS e NGS. Após o puerpério, porém, as mulheres do grupo GS apresentam aumento das frequências das células B produtoras de IL10. O facto de no período pós-parto se terem encontrado igualmente mais células B da subpopulação CD24^{Hi}CD38^{Hi} em circulação, uma população na qual se descreve na literatura uma maior capacidade de produção de IL10 (142, 577), parece assim relacionar-se com o aumento da frequência de células B produtoras de IL10 em mulheres do grupo GS após o puerpério.

Amoudruz e colaboradores não encontraram diferenças na produção de IL10 por PBMCs durante a gravidez e dois anos após o parto, o que parece contudo indicar que o aumento observado na produção de IL10 pelas células B após o puerpério possa ser temporário (582).

Para a asma, outros estudos têm avaliado a produção de IL10, usando abordagens semelhantes, com a produção de IL10 por PBMCs, mas também acompanhando os níveis séricos da citocina (583, 584). Comparando mulheres asmáticas e não asmáticas (583), ou mulheres alérgicas e não alérgicas (582), não foram identificadas diferenças em relação à produção de IL10 por PBMCs após estimulação. Apesar das diferenças na metodologia entre estes estudos e o trabalho presente, há algum paralelismo entre os resultados. Na comparação entre os grupos NGA e NGS, há um aumento das subpopulações de células T produtoras de IL10, mas não se verificam alterações nas células B.

No contexto perinatal, os níveis séricos de IL10 foram reportados como estando aumentados, no momento do parto, em mães alérgicas, e também na sua descendência (584). No presente estudo, as mulheres do grupo GA apresentaram também percentagens mais elevadas de células B produtoras de IL10 em relação às mulheres do grupo GS, mas o mesmo não se identificou para as células T. Será importante reforçar aqui que várias subpopulações de células T podem secretar IL10, como acontece com as células Treg, mas também com as células Th2 (272, 585). As mesmas células Th2 que, por sua vez, se associam ao perfil imune da gravidez e ao perfil imune observado em indivíduos atópicos. Este pressuposto suportará assim os níveis semelhantes de secreção de IL10 pelas células T observado em mulheres dos grupos GA, GS e NGA. Há ainda a salientar que, no terceiro trimestre da gravidez, as mulheres GA apresentam

maior capacidade de secreção de IL10 pelas células B estimuladas, quando comparadas com mulheres GS, ainda que se mantenham semelhantes os níveis de células B CD24^{Hi}CD38^{Hi}.

De estudos farmacológicos poderá acrescentar-se alguma informação adicional, uma vez que a terapêutica com ICS conduzirá a um aumento dos níveis de secreção de IL10 por macrófagos alveolares após estimulação com LPS, apesar de este efeito não ser visível em monócitos do sangue periférico (516). Por outro lado, o montelucaste, mas sobretudo os ICS, mostraram-se capazes de induzir um aumento nos níveis séricos de IL10 em crianças asmáticas (586). Deste modo, a análise dos dados deste estudo sugere que os fármacos usados como terapêutica preventiva nas mulheres asmáticas poderão mediar o aumento da capacidade de secreção de IL10 em diferentes populações celulares.

É possível assim identificar alterações importantes no perfil regulador de células T e B em mulheres grávidas com asma e rinite alérgica. Ainda que a distribuição destas populações em sangue periférico possa não refletir exatamente o que acontece nos locais de inflamação, a caracterização dos perfis de linfócitos circulantes permitirá uma maior compreensão da fisiopatologia da asma e da rinite alérgica, com a potencial capacidade de identificação de marcadores de exacerbação.

5.8 Perfil citocínico global

Em relação aos perfis de diferenciação, no que se refere à produção de citocinas inflamatórias, IFN- γ e IL17, detetou-se um efeito da gravidez sobre a produção de IFN- γ , particularmente em mulheres asmáticas, que apresentaram no terceiro trimestre uma diminuição das células T secretoras de IFN- γ em relação a mulheres do grupo NGA. No entanto, após o puerpério, é significativa, em mulheres dos grupos GA e GS, a recuperação da secreção de IFN- γ quer na população de células T CD4 e quer na população de células T CD8.

Encontram-se na literatura resultados com níveis de produção de IFN- γ semelhantes ou diminuídos em mulheres grávidas saudáveis quando comparadas com mulheres não grávidas (272, 335, 587-589). No presente estudo, no grupo GS apenas se reportaram tendências sem significado estatístico para níveis de IFN- γ mais baixos no terceiro trimestre, como aliás se observou igualmente no trabalho de Sykes e colaboradores (590).

Para comparações em relação ao pós-parto, parecem subsistir resultados controversos. Halonen e colaboradores não encontraram diferenças estatisticamente significativas para a produção de IFN- γ por PBMCs, após estimulação, durante a gravidez e três meses após o parto (272). Keskinisula e colaboradores (591), por seu lado, descreveram um decréscimo da produção de IFN- γ por PBMCs durante a gravidez, em comparação com os níveis de produção observados 3 meses após o parto. Curiosamente, em ambos os estudos se utilizou o mesmo estímulo (Concanvalina A/PMA). O presente trabalho corrobora os resultados do último estudo, verificando igualmente uma menor capacidade de produção de IFN- γ durante a gravidez. Estes resultados vão ainda de encontro às observações feitas por Saito e colaboradores (589), completando-as, uma vez que se relata neste estudo a normalização das populações T CD4 e T CD8 produtoras de IFN- γ após o puerpério. Breckler e colaboradores (328) relataram de igual modo um acréscimo na resposta de IFN- γ em mulheres alérgicas e não alérgicas após o parto (em comparação com vários períodos durante a gravidez).

Os efeitos de hormonas da gravidez, tais como os estrogénios e a progesterona, na produção de IFN- γ podem explicar, pelo menos parcialmente, a oscilação nos níveis de IFN- γ durante a gravidez (592, 593). A acrescentar a estes dados, a prolactina, que aumenta de forma significativa após o parto, tem um efeito promotor em relação ao IFN- γ , eventualmente, conduzindo à recuperação observada nas respostas Th1 após a gravidez (592). Ao mesmo tempo, para evitar respostas Th1 pró-inflamatórias exacerbadas, a produção de IFN- γ pode ser limitada pelas células B CD24^{Hi}CD38^{Hi} (577), que como vimos, também se encontram aumentadas após o puerpério, explicando níveis comparáveis em mulheres não grávidas e grávidas no pós-parto.

Ainda em relação à produção de IFN- γ , mulheres asmáticas com doença controlada, mostraram o mesmo padrão que mulheres saudáveis durante a gravidez e depois do puerpério. No estudo de Rastogi e colaboradores (594), não foram observadas diferenças nas células T CD4 IFN- γ ⁺ em mulheres grávidas asmáticas desde a gravidez até o parto. No entanto, uma tendência não significativa para uma menor produção de IFN- γ durante a gravidez foi observada pelos autores, que verificaram também que o pós-parto foi acompanhado por um aumento significativo da quimiocina do perfil Th1, IP10 (*IFN- γ -inducible protein of 10kDa*), que é codificada por um gene de resposta precoce induzido pelo IFN- γ (595). Toldi e colaboradores (335) consideraram que níveis mais elevados de IFN- γ poderiam relacionar-se com asma não controlada durante a gravidez. Talvez por isso, nas mulheres asmáticas do presente estudo (com doença controlada), os níveis de células T a secretar IFN- γ se tenham mostrado comparáveis aos níveis de mulheres não asmáticas.

Também a produção de IL17 foi abordada no estudo de Toldi e colaboradores (335). Estes autores descreveram frequências elevadas de células T CD4 IL17⁺ e frequências diminuídas de células T CD8 IL17⁺ em mulheres asmáticas não grávidas, quando comparadas com não grávidas, não asmáticas. Um estudo recente, porém, não encontrou diferenças nos níveis de células T CD4 produtoras de IL17 em PBMCs, esputo induzido, lavado broncoalveolar ou biópsias brônquicas de indivíduos asmáticos, em comparação com não asmáticos (596). Acrescentando mais controvérsia a esta abordagem, as células T produtoras de IL17 parecem estar envolvidas na patogénese da rinite alérgica, observando-se valores mais elevados em doentes com rinite em relação a controlos saudáveis (597). Apesar disto, mulheres com rinite alérgica têm menos células T produtoras de IL17 do que homens com rinite alérgica. Ainda a salientar que crianças com asma alérgica e rinite apresentam diminuição dos níveis de células T CD4 IL17⁺ após tratamento com ICS associados a LABA (598).

À luz dos nossos dados, podemos tentar comentar as diferenças observadas entre alguns estudos, uma vez que se avaliaram em simultâneo a secreção de IL17, mas também de IFN- γ . De facto, após a estimulação, uma grande percentagem de células (tanto CD4 ou CD8) produzem IFN- γ , com a percentagem de células T IL17⁺ a ser muito menor. No entanto, ainda há uma pequena proporção de células T polifuncionais que expressam ambas as citocinas. Assim, quando considerada separadamente, isto é, sem a avaliação das outras citocinas como o IFN- γ , a secreção de IL17 pode de algum modo ser sobrestimada, uma vez que desta forma, nas células Th17 ou Tc17 serão incluídas igualmente células polifuncionais.

Na verdade, neste estudo, não se observaram diferenças entre os grupos, considerando a secreção de IL17 por células T CD4. No compartimento T CD4, as diferenças surgiram especificamente na população de células T polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺, com as mulheres GA a apresentar valores mais elevados em relação a mulheres GS. Para as células T CD8, foi observado um perfil semelhante, não só nas células polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺, mas também para células produtoras de IL17 apenas (Tc17). Em suma, na gravidez, em mulheres asmáticas controladas, sob terapêutica, existe um aumento das percentagens de células T CD4 e CD8 polifuncionais IFN- γ ⁺IL17⁺.

A informação disponível na literatura sobre estas células polifuncionais é escassa, contudo esta subpopulação parece coordenar a inflamação local dos tecidos e tem baixa suscetibilidade às ações das células Treg (599). Além disso, são células que expressam normalmente CD161, e Gonzalez e colaboradores (98) descreveram uma migração preferencial de células T CD3 CD161⁺IFN- γ ⁺IL17⁺ da periferia para o pulmão. Lembrando ainda que estas células podem ser um passo intermédio da diferenciação Th17 em direção à diferenciação Th1, bem como a existência não só de células polifuncionais Th17/Th1, mas também Th17/Th2 (600), acreditamos que, no futuro, a caracterização destas subpopulações em doenças alérgicas como a asma, possam trazer novos conceitos sobre a sua patogénese e sobre os seus mecanismos inflamatórios.

5.9 Marcadores de Risco

A asma é uma das doenças respiratórias crónicas mais frequentes na infância (397). A par com outras doenças atópicas, como a rinoconjuntivite alérgica ou o eczema atópico, os seus efeitos na qualidade de vida das crianças asmáticas e das suas famílias são consideráveis. Do ponto de vista do acompanhamento das crianças, as doenças atópicas representam igualmente um desafio para clínicos e pais. Numa escala maior, acrescentam-se para estas patologias importantes custos socio-económicos (601, 602).

Olhando para a crescente prevalência das doenças atópicas ao longo das últimas décadas, urge estabelecer estratégias de prevenção que permitam modificar a sua ocorrência (603, 604). No entanto, para que possa instituir-se qualquer estratégia de prevenção primária, que atinja indivíduos com risco de desenvolvimento de doenças atópicas, o primeiro passo terá de passar pela identificação de biomarcadores clínicos, imunológicos ou genéticos, precoces e fiáveis, que possam ser preditivos do desenvolvimento destas doenças (602-604). Só a partir da identificação dos indivíduos em risco se poderá partir depois para uma intervenção adequada ao nível das metodologias a aplicar (602, 603), que podem incluir estratégias de exposição a alérgenos e a outros fatores adjuvantes, mas também intervenções farmacológicas, e ainda ao nível do *timing* da intervenção (605). A literatura parece indicar que a remodelação das vias respiratórias e a inflamação eosinofílica estejam já estabelecidas aos 6 anos de idade, mas não aos 2 anos, o que aponta exatamente para a necessidade de uma intervenção precoce e temporalmente adequada (604, 606, 607).

Considerando a importância da história materna de asma e atopia para o desenvolvimento destas doenças na descendência, este estudo, pretendeu ir ao encontro desta necessidade de intervenção precoce e de identificação precoce de marcadores de risco para o desenvolvimento de asma e doenças atópicas na infância. A história familiar de asma e atopia, sobretudo materna,

é por si só um fator de risco para o desenvolvimento das doenças atópicas, mas esta observação ultrapassa os limites da transmissão genética clássica (502), estendendo-se à imunomodulação intrauterina do sistema imunitário fetal em desenvolvimento (346, 354) ou à sensibilização alérgica, também visível desde o período pré-natal (344, 608).

Grande parte das crianças com asma e atopia apresentam manifestações destas doenças desde muito cedo, o que acentua por sua vez a importância do período intrauterino e da primeira infância (609). Assim, a caracterização do perfil imunológico de mulheres atópicas, particularmente com asma e rinite alérgica, pretendia exatamente encontrar perfis distintos nas células e mediadores imunes durante a gravidez e no período perinatal, de modo a inferir acerca das suas relações com o risco atópico observado nas crianças.

No presente estudo, no que concerne à ocorrência de manifestações de risco para atopia nos primeiros seis meses de vida (eczema e sibilância recorrente), encontrou-se uma prevalência considerável no grupo de mulheres GA. Quase metade dos filhos de mulheres GA (41%) apresentaram eczema e/ou sibilância, contra apenas três crianças observadas em GS (7%). Estes dados parecem reforçar a história materna de atopia como um fator de risco para as doenças atópicas. Em linha também com a literatura, a ocorrência de manifestações de risco para atopia foi igualmente mais frequente em crianças do sexo masculino (415, 422, 423).

O facto de as crianças terem sido seguidas apenas até aos 6 meses de vida é uma limitação do presente estudo, uma vez que as manifestações atópicas podem surgir mais tarde na vida da criança. Por esse motivo, uma das perspetivas futuras deste estudo é o seguimento longitudinal destas crianças. Desta forma, os resultados obtidos nesta fase inicial poderão ser abordados e reavaliados à luz dos novos dados, eventualmente já com confirmações objetivas da presença de atopia.

Na avaliação dos grupos de mulheres GA com (GA DA) e sem (GA SDA) manifestações de risco para atopia na descendência, não foi efetuada a posterior subdivisão das mulheres com descendência com risco de atopia em termos de manifestações de eczema ou sibilância recorrente. Contudo, a análise comparativa entre os dois subgrupos referidos (GA DA e GA SDA), retirando as mulheres apenas com eczema na descendência do subgrupo GA DA, não mostrou diferenças nos resultados encontrados.

As mulheres GA com manifestações de risco para atopia na descendência apresentaram uma maior proporção de células T e menor proporção de células B. A única alteração no compartimento T cingiu-se às células T CD8 de memória efectoras, curiosamente, mais elevadas em mulheres GA com descendência sem manifestações de risco para atopia.

É o compartimento B, mais negligenciado na literatura desta área, que mostra uma variação mais significativa entre as grávidas com e sem descendência atópica. Assim, as mulheres com descendência com manifestações de risco para atopia surgem com contagens absolutas mais baixas de células B de memória, mas, de forma expressiva, vêm aumentando o seu *pool* de células de transição, em relação a mulheres grávidas sem manifestações de risco para atopia na descendência até aos 6 meses de idade. Parece possível concluir assim a favor de um compartimento B menos representado, mas, sobretudo, mais imaturo em mulheres grávidas com descendência atópica.

A completar estas observações, com a aplicação das várias ferramentas estatísticas usadas na abordagem dos fatores de risco para atopia, exatamente a população B de transição, sobretudo identificada pela forte expressão de IgM e CD38, foi o marcador de risco mais efetivo para a predição de manifestações de risco de atopia na descendência (quer em termos de *Odds-ratio*, quer em termos de sensibilidade e especificidade).

As células B que saem da medula óssea para a circulação são células B imaturas, as chamadas células B de transição. A maior parte das células B neste estadio expressa a molécula CD5. Como se verifica no acompanhamento da reconstituição imune em doentes pós-transplante de medula óssea, é exatamente esta população B CD5⁺ a primeira a surgir, e a manter níveis significativos na circulação até ao restabelecimento imunitário (610, 611). No nascimento, aproximadamente metade das células B circulantes são exatamente células B de transição. Depois de o seu número aumentar até aos 4 meses de idade, traduzindo provavelmente um maior *output* medular nesta faixa etária, as células de transição vão sofrendo, até à idade adulta, reduções significativas nos seus valores (611, 612). Recentemente o grupo de Lundell e colaboradores (613) observou que crianças com doença alérgica aos 18 e aos 36 meses de idade, apresentavam no parto e um mês após o parto, valores mais elevados de células B CD5⁺, células que se encontram maioritariamente na população de células B de transição (CD24^{Hi}CD38^{Hi}).

É interessante olhar para os dados do presente estudo à luz destas constatações. Durante a gravidez, é exatamente um maior compartimento de células B de transição (identificadas através da expressão de IgM e CD38, ou através da expressão de CD38 e CD24) que parece relacionar-se com o desenvolvimento de manifestações atópicas na descendência. Ainda que não tenhamos avaliado o sangue da criança em paralelo, esta aparente concordância entre o observado nas mulheres grávidas atópicas e o observado por Lundell e colaboradores (613) em crianças alérgicas parece reforçar o papel das células de transição no estabelecimento das respostas atópicas, mas concorre de igual modo para a modulação materna do sistema imunitário fetal. É verdade que nem todas as crianças alérgicas do estudo sueco eram filhas de mães alérgicas, apesar de a percentagem ser superior a 50%, e que no grupo GS do presente estudo, praticamente não se verificaram manifestações atópicas na descendência. Porém, este pode ser exatamente um dos mecanismos pelos quais se verifica a atopia materna como um fator de risco para a descendência.

Neste sentido, os mesmos autores observaram ainda que níveis de BAFF no nascimento se correlacionam negativamente com as células imaturas/de transição, e sobretudo, com o desenvolvimento de atopia (612). No recém-nascido, níveis elevados de BAFF condicionam igualmente uma maturação mais rápida do compartimento B (612). Em mulheres expostas a ambientes rurais, tradicionalmente vistos como protetores para a atopia, há um aumento dos níveis de BAFF, o que condicionará a maturidade do compartimento B circulante nestas mulheres (612). Esta ligação entre o compartimento B, o BAFF e o risco de atopia também parece reforçada ainda com o facto de o sangue do cordão de bebés do sexo masculino apresentar níveis de BAFF mais baixos do que o sangue do cordão de bebés do sexo feminino (612). Contudo, os níveis séricos de BAFF parecem não só estar aumentados em doentes com asma, mas também se associam com a gravidade da doença (217, 218), o que levanta ainda questões a esclarecer no futuro, nomeadamente acerca da sua relação com o compartimento B na asma e na atopia, e se de alguma forma a gravidez condiciona estas relações. Um outro ponto que

deverá ser alvo de investigação é a presença de uma importante capacidade reguladora associada ao fenótipo B de transição CD24^{Hi}CD38^{Hi}, e de que forma um aumento nesta população parece relacionar-se com o risco de atopia.

Parece inegável, porém, que a imaturidade do compartimento B periférico é um elemento importante para o estabelecimento da doença alérgica na primeira infância. A hipótese higiénica, aliás, propõe que o atraso da maturação do sistema imunitário, promovida pela reduzida exposição a microrganismos no início da vida, seja um fator de risco para atopia (191).

No estudo de Tucson foi mesmo documentado um risco elevado de sibilância recorrente no primeiro ano de vida em crianças com limitação da produção de IFN- γ após o nascimento e nos primeiros três meses de vida, e a literatura sugere que de alguma forma esta alteração possa ser modulada pelo sistema imune materno (353, 354), apesar de não se ter verificado qualquer alteração quer na produção de IFN- γ pelas células T, quer nos níveis séricos de citocina no presente estudo, na comparação de mulheres atópicas com e sem manifestações de risco para a atopia na descendência.

Com o compartimento B, o cenário mostrou-se diferente, como já se referiu. O dado novo que o presente trabalho adiciona a estes conceitos é exatamente o facto de que a imaturidade B tem raízes mais profundas, estabelecendo-se provavelmente a partir de uma maior imaturidade do sistema imunitário materno, ele próprio com um compartimento B mais imaturo. Ao nível do risco para a atopia na descendência, acrescenta-se ainda a possibilidade de um marcador não invasivo para a criança, que facilmente pode ser englobado no âmbito dos normais rastreios maternos durante a gravidez, e que apresenta a vantagem da precocidade do diagnóstico, permitindo não só a possibilidade de prevenção pós-natal, mas estendendo esta possibilidade ao período gestacional.

A abordagem destes parâmetros, através da aplicação, a curto prazo, de um modelo de regressão logística recorrendo a uma abordagem bayesiana, será uma mais-valia na sua avaliação, e fortalecerá a sua aplicação para o fim pretendido, como fatores de risco para o desenvolvimento de atopia em filhos de mulheres atópicas.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

As principais conclusões do estudo são efetivamente a identificação de um perfil imunológico característico em mulheres atópicas, com asma controlada e medicada. Particularmente no que concerne aos linfócitos T e B, destaca-se um importante acréscimo das respetivas subpopulações de memória.

É de salientar, desde logo, o seu pioneirismo no que se refere à avaliação do compartimento B. Pela primeira vez, em mulheres grávidas atópicas, desde o terceiro trimestre da gravidez até depois do puerpério, foi abordado este compartimento, não só em relação ao seu perfil maturativo, mas também no que se refere a subpopulações de células B com funções reguladoras.

O perfil característico da mulher atópica sofre alterações significativas durante a gravidez, aproximando-se fortemente do perfil imunológico observado em mulheres saudáveis, agora com uma projeção do componente de neutrófilos circulantes, e em relação ao compartimento linfocitário, com menos células B.

No fim do puerpério documentou-se a tendência para a normalização do perfil imunológico na mulher atópica, mas ainda com alterações significativas, sobretudo no compartimento B, onde as células B de transição aumentam de forma importante.

As mesmas células B de transição vão sobressair no risco para a atopia na descendência de mulheres atópicas, surgindo como um parâmetro de potencial utilização como fator preditivo, já que apresentou o melhor desempenho em termos de sensibilidade e especificidade.

Um dos objetivos futuros, que surge da análise final deste trabalho é a validação dos marcadores preditivos identificados. Esta abordagem poderá incluir, por um lado, o desenvolvimento de modelos estatísticos que possam completar esta análise, e por outro lado, alargar o acompanhamento das crianças de forma a poder avaliar-se o impacto dos parâmetros agora estudados no desenvolvimento futuro de doenças atópicas.

Uma vez que apenas se identificaram situações esparsas e sem características distintivas na população de mulheres grávidas asmáticas acompanhada no que se refere a episódios de agudização das doenças de base durante a gravidez e até ao fim do puerpério, não foi possível a avaliação de marcadores de risco para esta ocorrência.

É importante referir ainda que as conclusões deste trabalho deverão ser validadas e reforçadas em estudos futuros, que possam incluir uma população de maiores dimensões, o que não foi possível com este trabalho.

Parece oportuno também refletir acerca da necessidade crescente de harmonização, sobretudo no campo da Imunologia clínica, no que se refere a protocolos e estratégias de caracterização de populações celulares, no âmbito da diversidade encontrada na revisão da literatura efetuada.

7. Referências

1. Malik A, Batra JK. Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: involvement in host defence against pathogens. *Crit Rev Microbiol*. 2012;38(2):168-81. Epub 2012/01/14.
2. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma--a review. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015;209:13-6. Epub 2014/12/17.
3. Zimmermann M, Aguilera FB, Castellucci M, Rossato M, Costa S, Lunardi C, et al. Chromatin remodelling and autocrine TNF α are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat Commun*. 2015;6:6061.
4. Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2015;132(4):788-9.
5. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol*. 2010;3(2):111-28. Epub 2010/01/01.
6. Otsuka A, Kabashima K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy*. 2015;70(2):131-40. Epub 2014/09/25.
7. Cruse G, Bradding P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol*. 2015:pil: S0014-2999(15)00408-2. [Epub ahead of print].
8. Flodström-Tullberg M, Bryceson YT, Shi F-D, Höglund P, Ljunggren H-G. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):634-40.
9. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):788-98.
10. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;41:9-22.
11. O'Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015. Epub 2015/08/06.
12. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:163-83.
13. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16-34. Epub 2011/01/18.
14. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett*. 2010;584(24):4865-71. Epub 2010/11/30.
15. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-26. Epub 2002/03/26.
16. Markey KA, Gartlan KH, Kuns RD, MacDonald KP, Hill GR. Imaging the immunological synapse between dendritic cells and T cells. *J Immunol Methods*. 2015;423:40-4. Epub 2015/05/15.
17. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994;1(5):405-13. Epub 1994/08/01.
18. Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol*. 2000;165(3):1352-6. Epub 2000/07/21.
19. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-42. Epub 2013/03/09.
20. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:307-28. Epub 2004/03/23.
21. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):326-32. Epub 2005/05/12.

22. Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol.* 2009;10(4):375-84. Epub 2009/03/03.
23. Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev.* 2013;252(1):12-23. Epub 2013/02/15.
24. Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37(Suppl 1):S34-S45.
25. Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol.* 2009;10(3):281-8.
26. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med.* 1990;172(3):921-9. Epub 1990/09/01.
27. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1990;145(11):3796-806. Epub 1990/12/01.
28. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 1992;176(4):1091-8. Epub 1992/10/01.
29. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(13):6065-9. Epub 1992/07/01.
30. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993;260(5107):547-9. Epub 1993/04/23.
31. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010;327(5969):1098-102. Epub 2010/02/27.
32. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89. Epub 2010/03/03.
33. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggi FS, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148(7):2142-7. Epub 1992/04/01.
34. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature.* 1993;362(6417):245-8. Epub 1993/03/18.
35. Gessner A, Mohrs K, Mohrs M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol.* 2005;174(2):1063-72. Epub 2005/01/07.
36. Zygmunt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv Immunol.* 2011;109:159-96. Epub 2011/05/17.
37. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-69. Epub 2000/04/13.
38. Ferber IA, Lee HJ, Zonin F, Heath V, Mui A, Arai N, et al. GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol.* 1999;91(2):134-44. Epub 1999/05/05.
39. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 1991;254(5032):707-10. Epub 1991/11/01.
40. Hom JT, Estridge T. Antigen-induced recruitment of eosinophils: importance of CD4+ T cells, IL5, and mast cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73(3):305-11. Epub 1994/12/01.
41. Gauvreau GM, Ellis AK, Denburg JA. Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(9):1297-306. Epub 2009/07/23.
42. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):701-21 e1-70. Epub 2011/03/08.

43. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
44. Unutmaz D. RORC2: The master of human Th17 cell programming. *Eur J Immunol*. 2009;39(6):1452-5.
45. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007;8(9):967-74. Epub 2007/06/22.
46. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942-9. Epub 2007/08/07.
47. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 2012;181(1):8-18. Epub 2012/05/30.
48. Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez MG, et al. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2014;40(4):594-607. Epub 2014/04/02.
49. Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu DX, Maganto-Garcia E, Azcutia V, et al. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol*. 2012;188(12):6287-99. Epub 2012/05/09.
50. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *PLoS One*. 2010;5(1):e11111. Epub 2010-01-14 00:00:00. 335-43 p.
51. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64. Epub 1995/08/01.
52. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):558-65.
53. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61. Epub 2003/01/11.
54. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6. Epub 2003/03/04.
55. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203.
56. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11.
57. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-86. Epub 2003/12/17.
58. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Zhang H, et al. TGF- β induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004;4(10):1614-27. Epub 2004/09/16.
59. Zhang H, Kong H, Zeng X, Guo L, Sun X, He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med*. 2014;12:125-.
60. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*. 2012;40(2):186-204. Epub 2012/01/10.
61. Valor L, Teijeiro R, Aristimuno C, Faure F, Alonso B, de Andres C, et al. Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(4):357-64. Epub 2010/12/01.

62. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004;104(9):2840-8. Epub 2004/07/09.
63. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(12):2076-84. Epub 2007/09/01.
64. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32. Epub 2008/06/21.
65. Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*. 2005;174(2):688-95. Epub 2005/01/07.
66. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2):240-9. Epub 2006/06/15.
67. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009;21(10):1105-11.
68. Szymczak-Workman AL, Workman CJ, Vignali DAA. Cutting Edge: Regulatory T Cells Do Not Require Stimulation through Their TCR to Suppress. *J Immunol*. 2009;182(9):5188-92.
69. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000;192(11):1553-62. Epub 2000/12/06.
70. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(12):1373-81. Epub 2001/06/20.
71. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192(11):1545-52. Epub 2000/12/06.
72. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One*. 2011;6(3):e17739. Epub 2011/03/23.
73. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63. Epub 2011/02/15.
74. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138-49.
75. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity*. 2008;29(1):127-37. Epub 2008/07/08.
76. King IL, Mohrs M. IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2009;206(5):1001-7. Epub 2009/04/22.
77. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*. 2015;75(1):14-24.
78. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011;17(8):975-82. Epub 2011/07/26.
79. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015;36(7):410-8.
80. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1347-55. Epub 2008/11/11.
81. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorp A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and

promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1341-6. Epub 2008/10/22.

82. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, et al. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol.* 2012;188(3):968-75. Epub 2011/12/20.

83. Chang H-C, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol.* 2010;11(6):527-34.

84. Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2014;35(2):61-8.

85. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):864-71.

86. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):857-63.

87. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3573-85. Epub 2009/11/19.

88. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):864-71. Epub 2009/07/07.

89. Cavani A, Pennino D, Eyerich K. Th17 and Th22 in skin allergy. *Chem Immunol Allergy.* 2012;96:39-44. Epub 2012/03/22.

90. Owen JL, Mohamadzadeh M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front Physiol.* 2013;4:159.

91. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. *Acta Med Port.* 2011;24 Suppl 4:967-76. Epub 2012/08/17. As quimiocinas e os seus receptores: características e funções fisiológicas.

92. Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011;11(2):139-45. Epub 2011/01/29.

93. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):648-55. Epub 2004/08/03.

94. Caccamo N, Dieli F. Are polyfunctional cells protective in *M. tuberculosis* infection? In: P-J. C, editor. *Understanding Tuberculosis-Analyzing the Origin of Mycobacterium tuberculosis Pathogenicity*. Rieka: InTech.; 2012. p. 313-42.

95. Makedonas G, Betts MR. Polyfunctional analysis of human T cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(3):209-19. Epub 2006/08/26.

96. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells. *J Virol.* 2007;81(16):8468-76.

97. Cosmi L, Maggi E, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A.* 2014;85(1):36-42. Epub 2013/09/07.

98. Gonzalez Y, Herrera MT, Juarez E, Salazar-Lezama MA, Bobadilla K, Torres M. CD161 Expression Defines a Th1/Th17 Polyfunctional Subset of Resident Memory T Lymphocytes in Bronchoalveolar Cells. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123591. Epub 2015/04/24.

99. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 2010;235(1):35-54. Epub 2010/06/12.

100. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev.* 2010;235(1):73-92.

101. Weigelin B, Krause M, Friedl P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett.* 2011;138(1):19-21.
102. Huber M, Lohoff M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis. *Allergo J Int.* 2015;24(1):8-15. Epub 2015/06/30.
103. Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(6):449-58. Epub 2014/06/01.
104. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in mouse and human. *Immunology.* 2012;136(3):283-90. Epub 2012/03/06.
105. Barakonyi A, Kovacs KT, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J. Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy. *J Immunol.* 2002;168(6):2683-8. Epub 2002/03/09.
106. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med.* 2008;59:281-92.
107. Oki S, Miyake S. Invariant natural killer T (iNKT) cells in asthma: a novel insight into the pathogenesis of asthma and the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. *Allergol Int.* 2007;56(1):7-14.
108. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877-900. Epub 2005/03/18.
109. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):231-7. Epub 2004/03/25.
110. Boyson JE, Aktan I, Barkhuff DA, Chant A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunol Invest.* 2008;37(5):565-82.
111. Kumar V. Innate lymphoid cells: New paradigm in immunology of inflammation. *Immunol Lett.* 2014;157(1-2):23-37.
112. Ozyigit LP, Morita H, Akdis M. Innate lymphocyte cells in asthma phenotypes. *Clin Transl Allergy.* 2015;5:23.
113. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):145-9. Epub 2013/01/26.
114. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):959-71.
115. Wang H, Feng J, Qi CF, Li Z, Morse HC, 3rd, Clarke SH. Transitional B cells lose their ability to receptor edit but retain their potential for positive and negative selection. *J Immunol.* 2007;179(11):7544-52. Epub 2007/11/21.
116. Sanz I. Rationale for B cell targeting in SLE. *Semin Immunopathol.* 2014;36(3):365-75. Epub 2014/04/26.
117. Chen K, Cerutti A. New Insights into the Enigma of Immunoglobulin D. *Immunol Rev.* 2010;237(1):160-79.
118. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000;192(10):1453-66. Epub 2000/11/21.
119. Samitas K, Lotvall J, Bossios A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58(3):209-25. Epub 2010/05/12.
120. Holodick NE, Rothstein TL. B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2015:n/a-n/a.
121. Weller S, Bonnet M, Delagreviere H, Israel L, Chrabieh M, Marodi L, et al. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood.* 2012;120(25):4992-5001. Epub 2012/09/25.
122. Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP, Nielsen KR, Varming K, et al. CD4dimCD25bright Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A.* 2007;71(6):371-8. Epub 2007/04/27.

123. Mongini PK, Inman JK. Cytokine dependency of human B cell cycle progression elicited by ligands which coengage BCR and the CD21/CD19/CD81 costimulatory complex. *Cell Immunol.* 2001;207(2):127-40. Epub 2001/03/13.
124. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):185-9.
125. Chan TD, Gatto D, Wood K, Camidge T, Basten A, Brink R. Antigen Affinity Controls Rapid T-Dependent Antibody Production by Driving the Expansion Rather than the Differentiation or Extrafollicular Migration of Early Plasmablasts. *J Immunol.* 2009;183(5):3139-49.
126. Al-Saud B, Al-Sum Z, Alassiri H, Al-Ghonaum A, Al-Muhsen S, Al-Dhekri H, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Characterization of Hyper-IgM Syndrome Due to CD40 Deficiency in Eleven Patients. *Journal of Clinical Immunology.* 2013;33(8):1325-35.
127. Aghamohammadi A, Parvaneh N, Rezaei N, Moazzami K, Kashef S, Abolhassani H, et al. Clinical and laboratory findings in hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. *Journal of Clinical Immunology.* 2009;29(6):769-76. Epub 2009/07/04.
128. Ishizaka A, Sakiyama Y, Nakanishi M, Tomizawa K, Oshika E, Kojima K, et al. The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1990;79(3):392-6. Epub 1990/03/01.
129. Turner JD, Faulkner H, Kamgno J, Kennedy MW, Behnke J, Boussinesq M, et al. Allergen-specific IgE and IgG4 are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. *Microbes Infect.* 2005;7(7-8):990-6.
130. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):421-34. Epub 2008/05/17.
131. Widhe M, Ekerfelt C, Forsberg P, Bergstrom S, Ernerudh J. IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease. *Scand J Immunol.* 1998;47(6):575-81. Epub 1998/07/04.
132. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(3):265-70. Epub 2006/04/18.
133. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine.* 2013;80(1):18-22. Epub 2012/08/04.
134. Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol.* 1974;113(6):1716-25. Epub 1974/12/01.
135. Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 1974;251(5475):550-1. Epub 1974/10/11.
136. Ryan JJ, Gress RE, Hathcock KS, Hodes RJ. Recognition and response to alloantigens in vivo. II. Priming with accessory cell-depleted donor allogeneic splenocytes: induction of specific unresponsiveness to foreign major histocompatibility complex determinants. *J Immunol.* 1984;133(5):2343-50. Epub 1984/11/01.
137. Takemori T, Rajewsky K. Specificity, duration and mechanism of idiotype suppression induced by neonatal injection of monoclonal anti-idiotope antibodies into mice. *Eur J Immunol.* 1984;14(7):656-67. Epub 1984/07/01.
138. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(6):2271-8. Epub 1996/12/01.
139. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002;16(2):219-30. Epub 2002/03/01.
140. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41. Epub 2012/01/10.
141. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607-12. Epub 2015/04/23.

142. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40. Epub 2010/01/19.
143. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41. Epub 2010/10/22.
144. Griffin DO, Rothstein TL. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Mol Med*. 2012;18:1003-8. Epub 2012/05/29.
145. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. 2015.
146. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *Lancet*. 2015;386(9998):1086-96.
147. Portelli MA, Hodge E, Sayers I. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):21-31. Epub 2014/04/29.
148. Prussin C, Yin Y, Upadhyaya B. Th2 heterogeneity: Does function follow form? *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1094-8.
149. Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM. Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1000-10 e3. Epub 2012/01/27.
150. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Park GT, Yang HS, Jang HY, et al. An association between IL-9 and IL-9 receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in a Korean population. *J Dermatol Sci*. 2011;62(1):16-21. Epub 2011/03/05.
151. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):821-6.
152. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22 producing "T22" T-cells account for up-regulated IL-22 in atopic dermatitis (AD), despite reduced IL-17 producing Th17 T-cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1244-52.e2.
153. Eyerich K, Eyerich S. Th22 cells in allergic disease. *Allergo J Int*. 2015;24(1):1-7.
154. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int*. 2008;57(2):121-34.
155. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(12):1847-57.
156. Frangova V, Sacco O, Silvestri M, Oddera S, Balbo A, Crimi E, et al. BAL neutrophilia in asthmatic patients. A by-product of eosinophil recruitment? *Chest*. 1996;110(5):1236-42. Epub 1996/11/01.
157. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*. 2006;7:135. Epub 2006/11/07.
158. Hsia BJ, Whitehead GS, Thomas SY, Nakano K, Gowdy KM, Aloor JJ, et al. Trif-dependent induction of Th17 immunity by lung dendritic cells. *Mucosal Immunol*. 2015;8(1):186-97. Epub 2014/07/06.
159. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):42-50. Epub 2002/12/24.
160. Ivanov S, Linden A. Th-17 cells in the lungs? *Expert Rev Respir Med*. 2007;1(2):279-93. Epub 2007/10/01.
161. Zhao Y, Yang J, Gao Y, Guo W. Th17 Immunity in Patients with Allergic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):297-307.
162. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(3):430-8. Epub 2001/09/07.

163. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(2):177-83. Epub 2001/09/01.
164. Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Matsukura S, Hoshino H, Ieki K, et al. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(5):804-9. Epub 2001/11/03.
165. Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG, Rothenberg ME, Foster PS. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol*. 2000;164(4):2142-50. Epub 2000/02/05.
166. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1993;177(2):573-6. Epub 1993/02/01.
167. Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DY, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol*. 1996;157(4):1432-9. Epub 1996/08/15.
168. Yeung VP, Gieni RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J Immunol*. 1998;161(8):4146-52. Epub 1998/10/21.
169. Vock C, Hauber H-P, Wegmann M. The Other T Helper Cells in Asthma Pathogenesis. *J Allergy (Cairo)*. 2010;2010.
170. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. 1997;275(5296):77-9. Epub 1997/01/03.
171. Chu HW, Honour JM, Rawlinson CA, Harbeck RJ, Martin RJ. Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice. *Infect Immun*. 2003;71(3):1520-6. Epub 2003/02/22.
172. Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med*. 1998;187(4):561-9. Epub 1998/03/28.
173. Tang L, Benjaponpitak S, DeKruyff RH, Umetsu DT. Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(3):428-35. Epub 1998/10/13.
174. Mitchell C, Provost K, Niu N, Homer R, Cohn L. IFN-gamma acts on the airway epithelium to inhibit local and systemic pathology in allergic airway disease. *J Immunol*. 2011;187(7):3815-20. Epub 2011/08/30.
175. Huang TJ, MacAry PA, Eynott P, Moussavi A, Daniel KC, Askenase PW, et al. Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma. *J Immunol*. 2001;166(1):207-17. Epub 2000/12/21.
176. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(6):700-6.
177. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest*. 1999;103(2):175-83. Epub 1999/01/23.
178. Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS, Thakker P, Pelker JW, Declercq C, et al. TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):309-15. Epub 2005/02/08.
179. Hayashi N, Yoshimoto T, Izuhara K, Matsui K, Tanaka T, Nakanishi K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-gamma and IL-13 production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14765-70. Epub 2007/09/04.
180. Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E, et al. IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. *J Immunol*. 2001;167(3):1769-77. Epub 2001/07/24.

181. Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol*. 1999;162(4):2375-83. Epub 1999/02/11.
182. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(2):161-6. Epub 2005/03/15.
183. Vock C, Hauber HP, Wegmann M. The other T helper cells in asthma pathogenesis. *J Allergy (Cairo)*. 2010;2010:519298. Epub 2010/10/27.
184. Annunziato F, Cosmi L, Manetti R, Brugnolo F, Parronchi P, Maggi E, et al. Reversal of human allergen-specific CRTH2+ T(H)2 cells by IL-12 or the PS-DSP30 oligodeoxynucleotide. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(5):815-21. Epub 2001/11/03.
185. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, et al. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1175-86 e7. Epub 2014/07/22.
186. Wang Y-H, Voo KS, Liu B, Chen C-Y, Uygungil B, Spoele W, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med*. 2010;207(11):2479-91.
187. Shirai T, Inui N, Suda T, Chida K. Correlation between peripheral blood T-cell profiles and airway inflammation in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):622-6. Epub 2006/09/05.
188. Tafuri A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*. 1995;270(5236):630-3. Epub 1995/10/27.
189. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol*. 2014;5(2). Epub 2014/11/25.
190. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):832-6.
191. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60. Epub 1989/11/18.
192. Platts-Mills TA. The allergy epidemics: 1870-2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):3-13. Epub 2015/07/07.
193. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med*. 2000;343(8):538-43. Epub 2000/08/24.
194. Pelucchi C, Galeone C, Bach JF, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):616-22 e7. Epub 2013/05/29.
195. Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet*. 1999;353(9163):1485-8. Epub 1999/05/08.
196. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(1):28-34. Epub 1999/03/03.
197. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:771-8.
198. Xystrakis E, Boswell SE, Hawrylowicz CM. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(2):121-33. Epub 2006/01/27.
199. Shi HZ, Li S, Xie ZF, Qin XJ, Qin X, Zhong XN. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol*. 2004;113(2):172-8. Epub 2004/09/29.
200. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1258-66. Epub 2007/04/07.

201. Haddeland U, Karstensen AB, Farkas L, Bo KO, Pirhonen J, Karlsson M, et al. Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(2):104-12.
202. Schaub B, Liu J, Hoppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, et al. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(6):1491-9, 9 e1-13.
203. Nieminen K, Laaksonen K, Savolainen J. Three-year follow-up study of allergen-induced in vitro cytokine and signalling lymphocytic activation molecule mRNA responses in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients undergoing specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(4):370-6. Epub 2009/07/03.
204. Provoost S, Maes T, van Durme YM, Gevaert P, Bachert C, Schmidt-Weber CB, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy*. 2009;64(10):1539-46. Epub 2009/04/28.
205. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy*. 2008;63(1):67-74. Epub 2007/12/07.
206. Hartmann S, Schnoeller C, Dahten A, Avagyan A, Rausch S, Lendner M, et al. Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1585-96. Epub 2009/06/11.
207. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(9):1314-23. Epub 2009/06/23.
208. Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in allergic asthma. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):2034-45.
209. La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol*. 2006;27(7):322-7.
210. De Vooght V, Carlier V, Devos FC, Haenen S, Verbeken E, Nemery B, et al. B-lymphocytes as key players in chemical-induced asthma. *PLoS One*. 2013;8(12):e83228. Epub 2013/12/19.
211. Shah A. The pathologic and clinical intersection of atopic and autoimmune disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(6):520-9. Epub 2012/08/18.
212. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Tobon GJ, Pers JO, Jousse-Joulin S, Saraux A. B cells in Sjogren's syndrome: from pathophysiology to diagnosis and treatment. *J Autoimmun*. 2012;39(3):161-7. Epub 2012/07/04.
213. Pers JO, Le Pottier L, Devauchelle V, Saraux A, Youinou P. [B lymphocytes in Sjogren's syndrome]. *Rev Med Interne*. 2008;29(12):1000-6. Epub 2008/04/12. Les lymphocytes B dans le syndrome de Gougerot-Sjogren.
214. Bohacs A, Pallinger E, Tamasi L, Rigo J, Jr., Komlosi Z, Muller V, et al. Surface markers of lymphocyte activation in pregnant asthmatics. *Inflamm Res*. 2010;59(1):63-70. Epub 2009/08/29.
215. Saraclar Y, McGeady SJ, Mansmann HC, Jr. Lymphocyte subpopulations of atopic children and the effect of therapy upon them. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;60(5):301-5. Epub 1977/11/01.
216. Lundell A-C, Hesselmar B, Nordström I, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher B-cell activating factor levels at birth are positively associated with maternal dairy farm exposure and negatively related to allergy development. *J Allergy Clin Immunol*. 2015.
217. Kang JS, Yoon YD, Ahn JH, Kim SC, Kim KH, Kim HM, et al. B cell-activating factor is a novel diagnosis parameter for asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(2):181-8. Epub 2006/08/11.
218. Liu W, Sun C, Luo X, Han M, Zhou L, Li J, et al. Elevated B cell-activating factor (BAFF) in children with allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(12):2156-60. Epub 2014/12/03.

219. He JS, Meyer-Hermann M, Xiangying D, Zuan LY, Jones LA, Ramakrishna L, et al. The distinctive germinal center phase of IgE+ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. *J Exp Med*. 2013;210(12):2755-71. Epub 2013/11/13.
220. Yang Z, Robinson MJ, Allen CD. Regulatory constraints in the generation and differentiation of IgE-expressing B cells. *Curr Opin Immunol*. 2014;28:64-70. Epub 2014/03/19.
221. Gould HJ, Ramadani F. IgE responses in mouse and man and the persistence of IgE memory. *Trends Immunol*. 2015;36(1):40-8. Epub 2014/12/17.
222. Berkowska MA, Heeringa JJ, Hajdarbegovic E, van der Burg M, Thio HB, van Hagen PM, et al. Human IgE(+) B cells are derived from T cell-dependent and T cell-independent pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):688-97 e6. Epub 2014/05/20.
223. Luger EO, Fokuhl V, Wegmann M, Abram M, Tillack K, Achatz G, et al. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(4):819-26 e4. Epub 2009/10/10.
224. Ghosh S, Hoselton SA, Schuh JM. Characterization of CD19(+)CD23(+)B2 lymphocytes in the allergic airways of BALB/c mice in response to the inhalation of *Aspergillus fumigatus* conidia. *Open Immunol J*. 2012;5:46-54.
225. Maddur MS, Sharma M, Hegde P, Stephen-Victor E, Pulendran B, Kaveri SV, et al. Human B cells induce dendritic cell maturation and favour Th2 polarization by inducing OX-40 ligand. *Nat Commun*. 2014;5:4092. Epub 2014/06/10.
226. Drake LY, Iijima K, Hara K, Kobayashi T, Kephart GM, Kita H. B cells play key roles in th2-type airway immune responses in mice exposed to natural airborne allergens. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121660. Epub 2015/03/25.
227. Lindell DM, Berlin AA, Schaller MA, Lukacs NW. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS One*. 2008;3(9):e3129. Epub 2008/09/05.
228. Vazquez-Tello A, Halwani R, Li R, Nadigel J, Bar-Or A, Mazer BD, et al. IL-17A and IL-17F expression in B lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(4):406-16. Epub 2011/11/30.
229. Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy*. 2014;69(11):1454-63. Epub 2014/07/26.
230. Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011;3(3):168-77. Epub 2011/07/09.
231. Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, et al. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1674-82. Epub 2013/03/29.
232. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1114-24 e8. Epub 2010/03/23.
233. Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol*. 2004;173(10):6346-56. Epub 2004/11/06.
234. Ostensen M, Villiger PM. Immunology of pregnancy-pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis. *Transpl Immunol*. 2002;9(2-4):155-60. Epub 2002/08/16.
235. Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett*. 2013;587(13):2074-8. Epub 2013/05/28.
236. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhani A, Janssen Bonas M, Dijkman TR, Labuda LA, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):517-28. Epub 2013/11/23.
237. Sorrentino R, Bertolino A, Terlizzi M, Iacono VM, Maiolino P, Cirino G, et al. B cell depletion increases sphingosine-1-phosphate-dependent airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;52(5):571-83. Epub 2014/09/25.

238. Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, Jitsukawa S, Kawata K, Yamashita K, et al. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin Immunol*. 2015;158(2):204-11. Epub 2015/04/02.
239. Mazer B. Is there a place for B cells as regulators of immune tolerance in allergic diseases? *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):469-71. Epub 2014/03/29.
240. Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J. Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(2):174-82.
241. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):676-80.
242. Nath P, Leung SY, Williams AS, Noble A, Xie S, McKenzie AN, et al. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13-/- mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(10):1427-35.
243. Umezu-Goto M, Kajiyama Y, Kobayashi N, Kaminuma O, Suko M, Mori A. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143 Suppl 1:76-9.
244. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. 2004;202:175-90.
245. Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, et al. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy*. 2008;63(3):327-32.
246. Osei-Kumah A, Smith R, Clifton VL. Maternal and cord plasma cytokine and chemokine profile in pregnancies complicated by asthma. *Cytokine*. 2008;43(2):187-93.
247. Pawankar R, Hayashi M, Yamanishi S, Igarashi T. The paradigm of cytokine networks in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(1):41-8. Epub 2014/12/06.
248. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(1):98-103.
249. Wisniewski JA, Borish L. Novel cytokines and cytokine-producing T cells in allergic disorders. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32(2):83-94.
250. Matsumoto T, Miike T, Yamaguchi K, Murakami M, Kawabe T, Yodoi J. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. *Clin Exp Immunol*. 1991;85(2):288-92. Epub 1991/08/01.
251. Daher S, Santos LM, Sole D, De Lima MG, Nasipitz CK, Musatti CC. Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1995;5(5):251-4. Epub 1995/09/01.
252. Hoekstra MO, Hoekstra Y, De Reus D, Rutgers B, Gerritsen J, Kauffman HF. Interleukin-4, interferon-gamma and interleukin-5 in peripheral blood of children with moderate atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(11):1254-60. Epub 1998/01/07.
253. Lama M, Chatterjee M, Nayak CR, Chaudhuri TK. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma levels in serum of children with asthma. *Cytokine*. 2011;55(3):335-8. Epub 2011/06/11.
254. Lee YC, Lee KH, Lee HB, Rhee YK. Serum levels of interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and interferon-gamma in acute asthma. *J Asthma*. 2001;38(8):665-71. Epub 2002/01/05.
255. Lacy P, Davoine F. Eosinophil cytokines: Emerging roles in immunity. *Front Immunol*. 2014;5.
256. Linden A, Dahlen B. Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2014;44(5):1319-31. Epub 2014/06/14.
257. Raeiszadeh Jahromi S, Mahesh PA, Jayaraj BS, Madhunapantula SR, Holla AD, Vishweswaraiah S, et al. Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma*. 2014;51(10):1004-13. Epub 2014/06/25.

258. Yuksel B, Aydemir C, Ustundag G, Eldes N, Kutsal E, Can M, et al. The effect of treatment with montelukast on levels of serum interleukin-10, eosinophil cationic protein, blood eosinophil counts, and clinical parameters in children with asthma. *Turk J Pediatr.* 2009;51(5):460-5. Epub 2010/02/02.
259. Prescott SL, King B, Strong TL, Holt PG. The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy.* 2003;58(11):1187-94.
260. Shi YH, Shi GC, Wan HY, Jiang LH, Ai XY, Zhu HX, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(13):1951-6. Epub 2011/11/18.
261. Kisielewicz A, Schaier M, Schmitt E, Hug F, Haensch GM, Meuer S, et al. A distinct subset of HLA-DR+ regulatory T cells is involved in the induction of preterm labor during pregnancy and in the induction of organ rejection after transplantation. *Clin Immunol.* 2010;137(2):209-20. Epub 2010/09/09.
262. La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett.* 2014;162(1 Pt A):41-8. Epub 2014/07/06.
263. Clark DA. Popular myths in reproductive immunology. *J Reprod Immunol.* 2014;104–105:54-62.
264. Alijotas-Reig J, Llurba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. *Placenta.* 2014;35(4):241-8. Epub 2014/03/04.
265. Hunt JS. Stranger in a strange land. *Immunol Rev.* 2006;213:36-47. Epub 2006/09/16.
266. Svensson-Arvelund J, Ernerudh J, Buse E, Cline JM, Haeger J-D, Dixon D, et al. The Placenta in Toxicology. Part II: Systemic and Local Immune Adaptations in Pregnancy. *Toxicol Pathol.* 2014;42(2):327-38.
267. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. Einstein (Sao Paulo). 2015;13(1):153-6. Epub 2015/03/26.
268. Rapacz-Leonard A, Dabrowska M, Janowski T. Major histocompatibility complex I mediates immunological tolerance of the trophoblast during pregnancy and may mediate rejection during parturition. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:579279. Epub 2014/05/09.
269. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* 2013;19(5):548-56. Epub 2013/05/09.
270. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:967629. Epub 2012/06/22.
271. Piccinni MP, Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, Romagnani S, Le Bouteiller P. T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. *Clin Mol Allergy.* 2015;13(1):9. Epub 2015/06/13.
272. Halonen M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol.* 2009;182(5):3285-93. Epub 2009/02/24.
273. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity.* 2002;17(1):7-17. Epub 2002/08/02.
274. Svensson-Arvelund J, Ernerudh J, Buse E, Cline JM, Haeger JD, Dixon D, et al. The placenta in toxicology. Part II: Systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicol Pathol.* 2014;42(2):327-38. Epub 2013/03/28.
275. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod.* 2001;16(10):2219-26. Epub 2001/09/28.
276. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 2000;15(3):713-8. Epub 2000/02/25.

277. Boij R, Svensson J, Nilsson-Ekdahl K, Sandholm K, Lindahl TL, Palonek E, et al. Biomarkers of coagulation, inflammation, and angiogenesis are independently associated with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(3):258-70. Epub 2012/05/26.
278. Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2010;25(10):2591-6. Epub 2010/08/06.
279. Wang WJ, Hao CF, Yi L, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol*. 2010;84(2):164-70. Epub 2010/01/29.
280. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-10. Epub 2010/05/12.
281. Ernerudh J, Berg G, Mjosberg J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66 Suppl 1:31-43. Epub 2011/07/08.
282. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, Ernerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J Immunol*. 2011;187(7):3671-82. Epub 2011/09/06.
283. Ruocco MG, Chaouat G, Florez L, Bensussan A, Klatzmann D. Regulatory T-cells in pregnancy: historical perspective, state of the art, and burning questions. *Front Immunol*. 2014;5:389. Epub 2014/09/06.
284. Tilburgs T, Strominger JL. CD8+ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(4):395-407.
285. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, Way SS. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*. 2012;490(7418):102-6. Epub 2012/10/02.
286. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol Reprod*. 2013;89(4):90. Epub 2013/08/30.
287. Muzzio D, Zygmunt M, Jensen F. The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:39. Epub 2014/04/20.
288. Enninga EA, Holtan SG, Creedon DJ, Dronca RS, Nevala WK, Ognjanovic S, et al. Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(4):520-35. Epub 2014/04/02.
289. Kota SK, Gayatri K, Jammula S, Kota SK, Krishna SVS, Meher LK, et al. Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metabol*. 2013;17(1):50-9.
290. Schjenken JE, Tolosa JM, Paul JW, Clifton VL, Smith R. Mechanisms of Maternal Immune Tolerance During Pregnancy In: (Ed.) DJZ, editor. *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. InTech; 2012. p. 211-42.
291. Hill PD, Chatterton RT, Jr., Aldag JC. Serum prolactin in breastfeeding: state of the science. *Biol Res Nurs*. 1999;1(1):65-75. Epub 2001/02/28.
292. Park D-W, Yang K-M. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38(4):179-85.
293. Xu Y, He H, Li C, Shi Y, Wang Q, Li W, et al. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice. *J Reprod Immunol*. 2011;91(1-2):17-23. Epub 2011/08/23.
294. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J Immunol*. 2011;187(4):1778-87. Epub 2011/07/20.
295. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolapchieva M, et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol*. 2009;182(9):5488-97. Epub 2009/04/22.
296. Koldehoff M, Katzorke T, Wisbrun NC, Propping D, Wohlers S, Bielfeld P, et al. Modulating impact of human chorionic gonadotropin hormone on the maturation and function of hematopoietic cells. *J Leukoc Biol*. 2011;90(5):1017-26. Epub 2011/09/01.

297. Polese B, Gridelet V, Araklioti E, Martens H, Perrier d'Hauterive S, Geenen V. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:106. Epub 2014/07/30.
298. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;38(1):13-22. Epub 2003/08/06.
299. Polanczyk MJ, Hopke C, Vandembark AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res*. 2006;84(2):370-8. Epub 2006/05/06.
300. Polanczyk MJ, Hopke C, Huan J, Vandembark AA, Offner H. Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol*. 2005;170(1-2):85-92. Epub 2005/10/29.
301. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandembark AA, Ziegler SF, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol*. 2004;173(4):2227-30. Epub 2004/08/06.
302. Pereira Suarez AL, Lopez-Rincon G, Martinez Neri PA, Estrada-Chavez C. Prolactin in inflammatory response. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:243-64. Epub 2014/12/05.
303. Persson M, Ekerfelt C, Ernerudh J, Matthiesen L, Abenius MS, Jonsson Y, et al. Reduced IFN-gamma and IL-10 responses to paternal antigens during and after pregnancy in allergic women. *J Reprod Immunol*. 2012;95(1-2):50-8. Epub 2012/07/13.
304. Prescott SL, Breckler LA, Witt CS, Smith L, Dunstan JA, Christiansen FT. Allergic women show reduced T helper type 1 alloresponses to fetal human leucocyte antigen mismatch during pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(1):65-72. Epub 2009/10/29.
305. Breckler LA, Hale J, Taylor A, Dunstan JA, Thornton CA, Prescott SL. Pregnancy IFN-gamma responses to foetal alloantigens are altered by maternal allergy and gravidity status. *Allergy*. 2008;63(11):1473-80. Epub 2008/10/18.
306. Shimojo N, Kohno Y, Katsuki T, Hoshioka A, Honma K, Saito K, et al. Diminished interferon-gamma (IFN-gamma) production by bacterial antigen-specific T cells in atopic patients. *Clin Exp Immunol*. 1996;106(1):62-6. Epub 1996/10/01.
307. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Macchia D, et al. Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur J Immunol*. 1992;22(6):1615-20. Epub 1992/06/01.
308. Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1288-96. Epub 1996/06/01.
309. Gentile DA, Patel A, Ollila C, Fireman P, Zeevi A, Doyle WJ, et al. Diminished IL-10 production in subjects with allergy after infection with influenza A virus. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(6):1045-8. Epub 1999/06/09.
310. Westergaard T, Begtrup K, Rostgaard K, Krause TG, Benn CS, Melbye M. Reproductive history and allergic rhinitis among 31145 Danish women. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(3):301-5. Epub 2003/03/05.
311. Tata LJ, Hubbard RB, McKeever TM, Smith CJ, Doyle P, Smeeth L, et al. Fertility rates in women with asthma, eczema, and hay fever: a general population-based cohort study. *Am J Epidemiol*. 2007;165(9):1023-30. Epub 2007/01/27.
312. Somoskovi A, Bartfai Z, Tamasi L, Kocsis J, Puho E, Czeizel AE. Population-based case-control study of allergic rhinitis during pregnancy for birth outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;131(1):21-7. Epub 2006/01/31.
313. Tedner SG, Ortqvist AK, Almqvist C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1430-47. Epub 2012/09/22.

314. Savilahti E, Siltanen M, Pekkanen J, Kajosaari M. Mothers of very low birth weight infants have less atopy than mothers of full-term infants. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(12):1851-4. Epub 2005/01/25.
315. Murphy VE, Gibson PG, Smith R, Clifton VL. Asthma during pregnancy: mechanisms and treatment implications. *Eur Respir J*. 2005;25(4):731-50.
316. Katz O, Sheiner E. Asthma and pregnancy: a review of two decades. *Expert Rev Respir Med*. 2008;2(1):97-107. Epub 2008/02/01.
317. Weatherhead S, Robson SC, Reynolds NJ. Eczema in pregnancy. *BMJ*. 2007;335(7611):152-4.
318. Incaudo GA, Takach P. The diagnosis and treatment of allergic rhinitis during pregnancy and lactation. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(1):137-54. Epub 2006/01/31.
319. Namazy JA, Schatz M. Asthma and pregnancy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1384-5 e2. Epub 2011/12/03.
320. Tamasi L, Horvath I, Bohacs A, Muller V, Losonczy G, Schatz M. Asthma in pregnancy--immunological changes and clinical management. *Respir Med*. 2011;105(2):159-64. Epub 2010/12/15.
321. Schatz M. Interrelationships between asthma and pregnancy: a literature review. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(2 Pt 2):S330-6. Epub 1999/02/09.
322. Tan KS, Thomson NC. Asthma in pregnancy. *Am J Med*. 2000;109(9):727-33. Epub 2001/01/04.
323. Gluck JC. The change of asthma course during pregnancy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26(3):171-80. Epub 2004/06/23.
324. Firoozi F, Ducharme FM, Lemi re C, Beauchesne M-F, Perreault S, Forget A, et al. Effect of fetal gender on maternal asthma exacerbations in pregnant asthmatic women. *Respir Med*. 2009;103(1):144-51.
325. Bonds RS, Midoro-Horiuti T. Estrogen effects in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(1):92-9. Epub 2012/10/24.
326. Shirasaki H, Watanabe K, Kanaizumi E, Konno N, Sato J, Narita S, et al. Expression and localization of steroid receptors in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*. 2004;124(8):958-63. Epub 2004/11/13.
327. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man S-FP, Sin DD. Estradiol Increases Mucus Synthesis in Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e100633.
328. Breckler LA, Hale J, Jung W, Westcott L, Dunstan JA, Thornton CA, et al. Modulation of in vivo and in vitro cytokine production over the course of pregnancy in allergic and non-allergic mothers. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(1 Pt 1):14-21. Epub 2009/06/06.
329. Kumru S, Boztosun A, Godekmerdan A. Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations and serum cytokine concentrations in healthy women. *J Reprod Med*. 2005;50(4):246-50. Epub 2005/05/27.
330. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*. 2004;112(1):38-43. Epub 2004/04/21.
331. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, et al. Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta*. 2006;27 Suppl A:S47-53. Epub 2006/01/31.
332. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, Utpatel K, Evert M, Zenclussen AC, et al. B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biol Reprod*. 2014;91(5):115. Epub 2014/09/12.
333. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-Garcia A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(6):448-53. Epub 2013/10/15.

334. Bohacs A, Cseh A, Stenczer B, Muller V, Galffy G, Molvarec A, et al. Effector and regulatory lymphocytes in asthmatic pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(6):393-401. Epub 2010/06/10.
335. Toldi G, Molvarec A, Stenczer B, Muller V, Eszes N, Bohacs A, et al. Peripheral T(h)1/T(h)2/T(h)17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. *Int Immunol.* 2011;23(11):669-77. Epub 2011/09/23.
336. Zhao JX, Zeng YY, Liu Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2007;75(2):71-81. Epub 2007/08/10.
337. Mao G, Wang J, Kang Y, Tai P, Wen J, Zou Q, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology.* 2010;151(11):5477-88. Epub 2010/09/17.
338. Shirshv SV, Orlova EG, Zamorina SA, Nekrasova IV. Influence of reproductive hormones on the induction of CD4(+)CD25 (bright)Foxp (3+) regulatory T cells. *Dokl Biol Sci.* 2011;440:343-6. Epub 2011/12/03.
339. Carter AM. Animal models of human placentation--a review. *Placenta.* 2007;28 Suppl A:S41-7. Epub 2007/01/02.
340. Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front Immunol.* 2014;5:196. Epub 2014/05/23.
341. Ostensen M, Sicher P, Forger F, Villiger PM. Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: a pilot study. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(2):318-20. Epub 2005/01/14.
342. Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Üblagger E, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):817-23.
343. Douwes J, Cheng S, Travier N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, et al. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J.* 2008;32(3):603-11. Epub 2008/05/02.
344. Conrad ML, Ferstl R, Teich R, Brand S, Blumer N, Yildirim AO, et al. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med.* 2009;206(13):2869-77. Epub 2009/12/10.
345. Li Y-F, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma*. *Chest.* 2005;127(4):1232-41.
346. Kim JH, Kim KH, Woo HY, Shim JY. Maternal cytokine production during pregnancy and the development of childhood wheezing and allergic disease in offspring three years of age. *J Asthma.* 2008;45(10):948-52. Epub 2008/12/17.
347. Soto-Ramirez N, Karmaus W, Yousefi M, Zhang H, Liu J, Gangur V. Maternal immune markers in serum during gestation and in breast milk and the risk of asthma-like symptoms at ages 6 and 12 months: a longitudinal study. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2012;8(1):11. Epub 2012/07/19.
348. Kaario H, Huttunen K, Karvonen AM, Schaub B, von Mutius E, Pekkanen J, et al. Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. *Clin Exp Allergy.* 2015. Epub 2015/09/13.
349. Sugiyama M, Arakawa H, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, et al. Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year. *Pediatrics.* 2007;119(3):e716-23. Epub 2007/03/03.
350. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000;55(8):688-97. Epub 2000/08/24.
351. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BW, et al. Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy.* 1992;22(12):1093-9. Epub 1992/12/01.

352. Holt PG, Macaubas C. Development of long-term tolerance versus sensitisation to environmental allergens during the perinatal period. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(6):782-7. Epub 1998/03/11.
353. Guerra S, Lohman IC, Halonen M, Martinez FD, Wright AL. Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):70-6. Epub 2003/10/04.
354. Kopp MV, Zehle C, Pichler J, Szepefalusi Z, Moseler M, Deichmann K, et al. Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(10):1536-43. Epub 2001/10/27.
355. Liu CA, Wang CL, Chuang H, Ou CY, Hsu TY, Yang KD. Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):899-904. Epub 2003/11/12.
356. Johnson CC, Ownby DR, Peterson EL. Parental history of atopic disease and concentration of cord blood IgE. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(6):624-9. Epub 1996/06/01.
357. Matson AP, Cloutier MM, Dhongade A, Puddington L, Rafti E. Maternal allergy is associated with surface-bound IgE on cord blood basophils. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(6):614-21.
358. Borrego LM, Arroz MJ, Videira P, Martins C, Guimaraes H, Nunes G, et al. Regulatory cells, cytokine pattern and clinical risk factors for asthma in infants and young children with recurrent wheeze. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(8):1160-9. Epub 2009/05/15.
359. Hrdý J, Kocourková I, Prokešová L. Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(1):10-7.
360. Schaub B, Liu J, Hoppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):774-82 e5. Epub 2009/04/08.
361. Wegienka G, Havstad S, Zoratti EM, Woodcroft KJ, Bobbitt KR, Ownby DR, et al. Regulatory T cells in prenatal blood samples: variability with pet exposure and sensitization. *J Reprod Immunol*. 2009;81(1):74-81. Epub 2009/06/24.
362. Barrett EG. Maternal Influence in the Transmission of Asthma Susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21(3):474-84.
363. Rowe J, Kusel M, Holt BJ, Suriyaarachchi D, Serralha M, Hollams E, et al. Prenatal versus postnatal sensitization to environmental allergens in a high-risk birth cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1164-73. Epub 2007/04/07.
364. Hanson LA, Silfverdal SA. The mother's immune system is a balanced threat to the foetus, turning to protection of the neonate. *Acta Paediatr*. 2009;98(2):221-8. Epub 2008/12/03.
365. Thompson EE, Myers RA, Du G, Aydelotte TM, Tisler CJ, Stern DA, et al. Maternal microchimerism protects against the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):39-44. Epub 2013/02/26.
366. Abrahamsson TR, Wu RY, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res*. 2015;77(1-2):214-9.
367. Bottcher MF, Jenmalm MC, Garofalo RP, Bjorksten B. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res*. 2000;47(1):157-62. Epub 2000/01/07.
368. Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Martinez FD. Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood. *Thorax*. 2001;56(3):192-7. Epub 2001/02/22.
369. Allam JP, Zivanovic O, Berg C, Gembruch U, Bieber T, Novak N. In search for predictive factors for atopy in human cord blood. *Allergy*. 2005;60(6):743-50.
370. Polte T, Hennig C, Hansen G. Allergy prevention starts before conception: maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(5):1022-30 e5.
371. Barrett EG. Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21(3):474-84.

372. Lendor C, Johnson A, Perzanowski M, Chew GL, Goldstein IF, Kelvin E, et al. Effects of winter birth season and prenatal cockroach and mouse allergen exposure on indoor allergen-specific cord blood mononuclear cell proliferation and cytokine production. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;101(2):193-9.
373. Szepefalusi Z, Loibichler C, Hanel-Dekan S, Dehlink E, Gerstmayr M, Pichler J, et al. Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(9):1130-7. Epub 2006/09/12.
374. Holloway JA, Warner JO, Vance GH, Diaper ND, Warner JA, Jones CA. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet.* 2000;356(9245):1900-2. Epub 2000/12/29.
375. Edelbauer M, Loibichler C, Nentwich I, Gerstmayr M, Urbanek R, Szepefalusi Z. Maternally delivered nutritive allergens in cord blood and in placental tissue of term and preterm neonates. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(2):189-93. Epub 2004/02/28.
376. Alford RH, Cartwright BB, Sell SH. Ontogeny of human cell-mediated immunity: age-related variation of in vitro infantile lymphocyte transformation. *Infect Immun.* 1976;13(4):1170-5.
377. Jones AC, Miles EA, Warner JO, Colwell BM, Bryant TN, Warner JA. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol.* 1996;7(3):109-16. Epub 1996/08/01.
378. Peters JL, Suglia SF, Platts-Mills TA, Hosen J, Gold DR, Wright RJ. Relationships among prenatal aeroallergen exposure and maternal and cord blood IgE: project ACCESS. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1041-6. Epub 2009/04/14.
379. Edenharter G, Bergmann RL, Bergmann KE, Wahn V, Forster J, Zepp F, et al. Cord blood-IgE as risk factor and predictor for atopic diseases. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(6):671-8. Epub 1998/07/24.
380. Sadeghnejad A, Karmaus W, Davis S, Kurukulaaratchy R, Matthews S, Arshad S. Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergic sensitisation at ages 4 and 10 and asthma at age 10. *Thorax.* 2004;59(11):936-42.
381. Pesonen M, Kallio MJ, Siimes MA, Elg P, Bjorksten F, Ranki A. Cord serum immunoglobulin E as a risk factor for allergic symptoms and sensitization in children and young adults. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(1):12-8. Epub 2008/02/27.
382. Schafer T, Dirschedl P, Kunz B, Ring J, Uberla K. Maternal smoking during pregnancy and lactation increases the risk for atopic eczema in the offspring. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(4):550-6. Epub 1997/04/01.
383. Simons E, To T, Moineddin R, Stieb D, Dell SD. Maternal second-hand smoke exposure in pregnancy is associated with childhood asthma development. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(2):201-7. Epub 2014/03/13.
384. Thacher JD, Gruziova O, Pershagen G, Neuman A, Wickman M, Kull I, et al. Pre- and postnatal exposure to parental smoking and allergic disease through adolescence. *Pediatrics.* 2014;134(3):428-34. Epub 2014/08/20.
385. Diaz-Sanchez D, Rumold R, Gong Jr H. Challenge with environmental tobacco smoke exacerbates allergic airway disease in human beings. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(2):441-6.
386. Singh SP, Gundavarapu S, Pena-Philippides JC, Rir-Sima-ah J, Mishra NC, Wilder JA, et al. Prenatal secondhand cigarette smoke promotes Th2 polarization and impairs goblet cell differentiation and airway mucus formation. *J Immunol.* 2011;187(9):4542-52. Epub 2011/09/21.
387. Collin SM, Granell R, Westgarth C, Murray J, Paul E, Sterne JA, et al. Pet ownership is associated with increased risk of non-atopic asthma and reduced risk of atopy in childhood: findings from a UK birth cohort. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(1):200-10. Epub 2014/08/01.
388. Collin SM, Granell R, Westgarth C, Murray J, Paul ES, Sterne JA, et al. Associations of Pet Ownership with Wheezing and Lung Function in Childhood: Findings from a UK Birth Cohort. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127756. Epub 2015/06/11.

389. Cuppari C, Manti S, Salpietro A, Alterio T, Arrigo T, Leonardi S, et al. Mode of delivery and risk for development of atopic diseases in children. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(5):344-51. Epub 2015/09/01.
390. Huang L, Chen Q, Zhao Y, Wang W, Fang F, Bao Y. Is elective cesarean section associated with a higher risk of asthma? A meta-analysis. *J Asthma.* 2014;52(1):16-25.
391. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. *Nature.* 2012;489(7415):231-41.
392. Renz-Polster H, David MR, Buist AS, Vollmer WM, O'Connor EA, Frazier EA, et al. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(11):1466-72. Epub 2005/11/22.
393. Abrahamsson TR, Wu RY, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res.* 2015;77(1-2):214-9. Epub 2014/10/14.
394. Hawrylowicz C, Ryanna K. Asthma and allergy: the early beginnings. *Nat Med.* 2010;16(3):274-5. Epub 2010/03/09.
395. Marketos SG, Ballas CN. Bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity. *J Asthma.* 1982;19(4):263-9. Epub 1982/01/01.
396. GINA Update 2015. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. Available from: <http://www.ginasthma.org/>. Assessed on 07/07/2015.
397. Petsios KT, Priftis KN, Hatziagorou E, Tsanakas JN, Antonogeorgos G, Matziou VN. Determinants of quality of life in children with asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48(12):1171-80. Epub 2013/02/13.
398. Bieber T. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med.* 2008;358(14):1483-94.
399. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008;63 Suppl 86:8-160. Epub 2008/03/26.
400. Baena-Cagnani CE. The global burden of asthma and allergic diseases: the challenge for the new century. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2001;1(4):297-8. Epub 2002/03/15.
401. Barnetson RSC, Rogers M. Childhood atopic eczema. *BMJ.* 2002;324(7350):1376-9.
402. Daley D. The evolution of the hygiene hypothesis: the role of early-life exposures to viruses and microbes and their relationship to asthma and allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014;14(5):390-6. Epub 2014/08/08.
403. Shreiner A, Huffnagle GB, Noverr MC. The "Microflora Hypothesis" of allergic disease. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:113-34. Epub 2008/10/10.
404. Asher MI, Weiland SK. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clin Exp Allergy.* 1998;28 Suppl 5:52-66; discussion 90-1. Epub 1999/02/13.
405. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax.* 2007;62(9):758-66. Epub 2007/05/17.
406. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma P. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy.* 2004;59(5):469-78.
407. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health.* 2012;12:204. Epub 2012/03/21.
408. Sa-Sousa A, Morais-Almeida M, Azevedo LF, Carvalho R, Jacinto T, Todo-Bom A, et al. Prevalence of asthma in Portugal - The Portuguese National Asthma Survey. *Clin Transl Allergy.* 2012;2(1):15. Epub 2012/08/31.
409. Pali-Scholl I, Jensen-Jarolim E. Allergic Diseases and Asthma in Pregnancy. www.worldallergy.org: WAO - World Allergy Organization; 2009 [updated 15.09.2015 15.08.2015].

410. Kwon HL, Belanger K, Bracken MB. Asthma prevalence among pregnant and childbearing-aged women in the United States: estimates from national health surveys. *Ann Epidemiol*. 2003;13(5):317-24. Epub 2003/06/25.
411. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-3. Epub 2007/07/06.
412. Ha SG, Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Rao A, Rao SP, et al. ORMDL3 promotes eosinophil trafficking and activation via regulation of integrins and CD48. *Nat Commun*. 2013;4:2479. Epub 2013/09/24.
413. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010;363(13):1211-21. Epub 2010/09/24.
414. Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int*. 2013;62(1):21-8. Epub 2013/02/27.
415. Dietert RR. Maternal and childhood asthma: Risk factors, interactions, and ramifications. *Reprod Toxicol*. 2011;32(2):198-204.
416. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-43.
417. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012;3(1):4-14. Epub 2012/02/24.
418. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *N Engl J Med*. 1995;332(3):133-8.
419. Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy*. 2008;63(11):1418-27. Epub 2008/10/18.
420. Osman M, Hansell AL, Simpson CR, Hollowell J, Helms PJ. Gender-specific presentations for asthma, allergic rhinitis and eczema in primary care. *Prim Care Respir J*. 2007;16(1):28-35. Epub 2007/02/14.
421. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ, Germolec DR, Korach KS, et al. It's all about sex: male-female differences in lung development and disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(8):308-13.
422. Clifton V. Maternal asthma during pregnancy and fetal outcomes: potential mechanisms and possible solutions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6(5):307-11. Epub 2006/09/07.
423. Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics*. 2001;108(2):E33. Epub 2001/08/03.
424. Morais-Almeida M, Gaspar A, Pires G, Prates S, Rosado-Pinto J. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(2):183-9. Epub 2007/05/08.
425. Belyhun Y, Amberbir A, Medhin G, Erko B, Hanlon C, Venn A, et al. Prevalence and risk factors of wheeze and eczema in 1-year-old children: the Butajira birth cohort, Ethiopia. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):619-26. Epub 2010/05/08.
426. Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(5):587-93. Epub 1998/05/26.
427. Hagendorens MM, Bridts CH, Lauwers K, van Nuijs S, Ebo DG, Vellinga A, et al. Perinatal risk factors for sensitization, atopic dermatitis and wheezing during the first year of life (PIPO study). *Clin Exp Allergy*. 2005;35(6):733-40. Epub 2005/06/23.
428. Hubeau C, Apostolou I, Kobzik L. Adoptively Transferred Allergen-Specific T Cells Cause Maternal Transmission of Asthma Risk. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1931-9.

429. Strachan DP, Ait-Khaled N, Foliaki S, Mallol J, Odhiambo J, Pearce N, et al. Siblings, asthma, rhinoconjunctivitis and eczema: a worldwide perspective from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):126-36. Epub 2014/06/11.
430. Gillam SJ, Jarman B, White P, Law R. Ethnic differences in consultation rates in urban general practice. *BMJ*. 1989;299(6705):953-7. Epub 1989/10/14.
431. Pattemore PK, Ellison-Loschmann L, Asher MI, Barry DM, Clayton TO, Crane J, et al. Asthma prevalence in European, Maori, and Pacific children in New Zealand: ISAAC study. *Pediatr Pulmonol*. 2004;37(5):433-42. Epub 2004/04/20.
432. Ellison-Loschmann L, Pattemore PK, Asher MI, Clayton TO, Crane J, Ellwood P, et al. Ethnic differences in time trends in asthma prevalence in New Zealand: ISAAC Phases I and III. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(6):775-82. Epub 2009/05/23.
433. Foliaki S, Annesi-Maesano I, Daniel R, Fakakovikaetau T, Magatongia M, Tuuau-Potoi N, et al. Prevalence of symptoms of childhood asthma, allergic rhinoconjunctivitis and eczema in the Pacific: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Allergy*. 2007;62(3):259-64. Epub 2007/02/15.
434. Tedeschi A, Barcella M, Bo GA, Miadonna A. Onset of allergy and asthma symptoms in extra-European immigrants to Milan, Italy: possible role of environmental factors. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(4):449-54. Epub 2003/04/12.
435. Forno E, Celedon JC. Asthma and ethnic minorities: socioeconomic status and beyond. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(2):154-60. Epub 2009/03/28.
436. Sonnenschein-van der Voort AMM, Arends LR, de Jongste JC, Annesi-Maesano I, Arshad SH, Barros H, et al. Preterm birth, infant weight gain, and childhood asthma risk: A meta-analysis of 147,000 European children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1317-29.
437. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(4):634-42.
438. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013;185(5):385-94. Epub 2013/02/13.
439. Nilsson L, Bjorksten B, Hattevig G, Kjellman B, Sigurs N, Kjellman N. Season of birth as predictor of atopic manifestations. *Arch Dis Child*. 1997;76(4):341-4.
440. Mitchell EA, Beasley R, Keil U, Montefort S, Odhiambo J, Group at IPTS. The association between tobacco and the risk of asthma, rhinoconjunctivitis and eczema in children and adolescents: analyses from Phase Three of the ISAAC programme. *Thorax*. 2012;67(11):941-9.
441. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1501-7. Epub 2000/05/12.
442. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2010;65(12):1045-52. Epub 2010/06/29.
443. Kieninger E, Regamey N. Rhinoviruses: markers of, or causative for, recurrent wheeze and asthma? *Eur Respir J*. 2012;39(2):238-9. Epub 2012/02/03.
444. Jartti T, Kuusipalo H, Vuorinen T, Soderlund-Venermo M, Allander T, Waris M, et al. Allergic sensitization is associated with rhinovirus-, but not other virus-, induced wheezing in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(7):1008-14. Epub 2010/10/28.
445. Ajamian F, Wu Y, Ebeling C, Illaraza R, Odemuyiwa SO, Moqbel R, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(3):644-59. Epub 2015/01/30.
446. Jeng MJ, Lee YS, Tsao PC, Yang CF, Soong WJ. A longitudinal study on early hospitalized airway infections and subsequent childhood asthma. *PLoS One*. 2014;10(4):e0121906. Epub 2015/04/29.
447. Finlay CM, Walsh KP, Mills KHG. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev*. 2014;259(1):206-30.

448. Custovic A, Simpson A. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(6):393-401; quiz follow Epub 2012/10/30.
449. Asher MI, Stewart AW, Mallol J, Montefort S, Lai CK, Ait-Khaled N, et al. Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the ecological analyses of ISAAC Phase One. *Respir Res*. 2010;11:8. Epub 2010/01/23.
450. Miller RL, Peden DB. Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1001-8. Epub 2014/12/03.
451. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med*. 1991;325(15):1067-71. Epub 1991/10/10.
452. Ulrik CS. Peripheral eosinophil counts as a marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(9):820-7. Epub 1995/09/01.
453. Beasley R, Semprini A, Mitchell EA. Risk factors for asthma: is prevention possible? *Lancet*. 2015;386(9998):1075-85.
454. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Tools used to measure airway remodelling in research. *Eur Respir J*. 2007;29(3):596-604. Epub 2007/03/03.
455. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010;137(6):1417-26.
456. Kerstjens HA, Brand PL, de Jong PM, Koeter GH, Postma DS. Influence of treatment on peak expiratory flow and its relation to airway hyperresponsiveness and symptoms. The Dutch CNSLD Study Group. *Thorax*. 1994;49(11):1109-15. Epub 1994/11/01.
457. Brand PL, Duiverman EJ, Postma DS, Waalkens HJ, Kerrebijn KF, van Essen-Zandvliet EE. Peak flow variation in childhood asthma: relationship to symptoms, atopy, airways obstruction and hyperresponsiveness. Dutch CNSLD Study Group. *Eur Respir J*. 1997;10(6):1242-7. Epub 1997/06/01.
458. Postma DS, Boezen MHM. Peak Expiratory Flow Monitoring in Older Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(10):1065-6.
459. Kourtis G, Caiaffa MF, Forte C, Scarlato MI, Macchia L. Retrospective monitoring in the management of persistent asthma. *Respir Care*. 2011;56(5):633-43. Epub 2011/02/01.
460. Baser S, Ozkurt S, Topuz B, Kiter G, Karabulut H, Akdag B, et al. Peak expiratory flow monitoring to screen for asthma in patients with allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(4):211-5. Epub 2007/08/19.
461. Small P, Kim H. Allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011;7 Suppl 1:S3. Epub 2011/12/15.
462. International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. *Allergy*. 1994;49(19 Suppl):1-34. Epub 1994/01/01.
463. Williams H, Stewart A, von Mutius E, Cookson W, Anderson HR. Is eczema really on the increase worldwide? *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(4):947-54 e15. Epub 2007/12/25.
464. Bjorksten B, Clayton T, Ellwood P, Stewart A, Strachan D. Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(2):110-24. Epub 2007/07/27.
465. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*. 2004;24(5):758-64. Epub 2004/11/02.
466. Canonica GW, Bousquet J, Mullol J, Scadding GK, Virchow JC. A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe. *Allergy*. 2007;62 Suppl 85:17-25. Epub 2007/12/06.
467. Todo-Bom A, Loureiro C, Almeida MM, Nunes C, Delgado L, Castel-Branco G, et al. Epidemiology of rhinitis in Portugal: evaluation of the intermittent and the persistent types. *Allergy*. 2007;62(9):1038-43. Epub 2007/08/10.
468. Morais-Almeida M, Nunes C, Gaspar A, Branco-Ferreira M. Rinite: Conhecimento epidemiológico em Portugal. *Rev Port ORL*. 2006;44 (2):149-60.

469. Morais-Almeida M, Pite H, Pereira AM, Todo-Bom A, Nunes C, Bousquet J, et al. Prevalence and classification of rhinitis in the elderly: a nationwide survey in Portugal. *Allergy*. 2013;68(9):1150-7. Epub 2013/08/08.
470. Björkstén F, Suoniemi I. Time and intensity of first pollen contacts and risk of subsequent pollen allergies. *Acta Med Scand*. 1981;209(4):299-303. Epub 1981/01/01.
471. Biagini JM, LeMasters GK, Ryan PH, Levin L, Reponen T, Bernstein DI, et al. Environmental risk factors of rhinitis in early infancy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(4):278-84. Epub 2006/06/15.
472. Osur SL. The management of asthma and rhinitis during pregnancy. *J Womens Health (Larchmt)*. 2005;14(3):263-76. Epub 2005/04/29.
473. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008*. *Allergy*. 2008;63:8-160.
474. GINA Major Revision. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014. Available from: <http://www.ginasthma.org/>. Assessed on 07/07/2015.
475. Chisaguano AM, Montes R, Castellote AI, Morales E, Julvez J, Vioque J, et al. Elaidic, vaccenic, and rumenic acid status during pregnancy: association with maternal plasmatic LC-PUFAs and atopic manifestations in infants. *Pediatr Res*. 2014;76(5):470-6. Epub 2014/08/15.
476. Broms K, Norback D, Eriksson M, Sundelin C, Svardsudd K. Prevalence and co-occurrence of parentally reported possible asthma and allergic manifestations in pre-school children. *BMC Public Health*. 2013;13:764. Epub 2013/08/21.
477. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351(9111):1225-32. Epub 1998/06/27.
478. Reimerink J, Stelma F, Rockx B, Brouwer D, Stobberingh E, Van Ree R, et al. Early-life rotavirus and norovirus infections in relation to development of atopic manifestation in infants. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(2):254-60.
479. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330-6.
480. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
481. Mjösberg J, Svensson J, Johansson E, Hellström L, Casas R, Jenmalm MC, et al. Systemic Reduction of Functionally Suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in Human Second Trimester Pregnancy Is Induced by Progesterone and 17 β -Estradiol. *J Immunol*. 2009;183(1):759-69.
482. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1425-33. Epub 2004/12/04.
483. Thunberg S, Gafvelin G, Nord M, Gronneberg R, Grunewald J, Eklund A, et al. Allergen provocation increases TH2-cytokines and FOXP3 expression in the asthmatic lung. *Allergy*. 2010;65(3):311-8. Epub 2009/10/23.
484. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(5):639-50. Epub 2008/05/17.
485. Kim YM, Kim YS, Jeon SG, Kim YK. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the th2 hypothesis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013;5(4):189-96. Epub 2013/07/03.
486. Karlsson F, Hassan-Zahraee M. Quantification of Th1 and Th17 Cells with Intracellular Staining Following PMA/Ionomycin Stimulation. *Curr Protoc Cytom*. 2015;71:6 35 1-7. Epub 2015/01/07.
487. Hinks TS, Zhou X, Staples KJ, Dimitrov BD, Manta A, Petrossian T, et al. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2015. Epub 2015/03/10.

488. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191-200.
489. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8(+) T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):749-61.
490. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
491. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186(9):1407-18. Epub 1997/11/14.
492. Foster AE, Marangolo M, Sartor MM, Alexander SI, Hu M, Bradstock KF, et al. Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood*. 2004;104(8):2403-9. Epub 2004/07/03.
493. Qureshi OS, Kaur S, Hou TZ, Jeffery LE, Poulter NS, Briggs Z, et al. Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J Biol Chem*. 2012;287(12):9429-40. Epub 2012/01/21.
494. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48. Epub 2005/03/18.
495. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2007;178(10):6624-33. Epub 2007/05/04.
496. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(5):261-71. Epub 2008/06/19.
497. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005;105(11):4390-8. Epub 2005/02/11.
498. Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol*. 2001;167(7):3610-8. Epub 2001/09/21.
499. Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2):33-50. Epub 2000/09/15.
500. Kraan J, Gratama JW, Keeney M, D'Hautcourt JL. Setting up and calibration of a flow cytometer for multicolor immunophenotyping. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2003;17(3):223-33. Epub 2003/10/04.
501. Dendrou CA, Fung E, Esposito L, Todd JA, Wicker LS, Plagnol V. Fluorescence intensity normalisation: correcting for time effects in large-scale flow cytometric analysis. *Adv Bioinformatics*. 2009:476106. Epub 2010/01/06.
502. Murphy VE, Schatz M. Asthma in pregnancy: a hit for two. *Eur Respir Rev*. 2014;23(131):64-8. Epub 2014/03/05.
503. Powell H, Murphy VE, Hensley MJ, Giles W, Clifton VL, Gibson PG. Rhinitis in pregnant women with asthma is associated with poorer asthma control and quality of life. *J Asthma*. 2015:1-8. Epub 2015/09/15.
504. Fogaca HR, Marson FA, Toro AA, Sole D, Ribeiro JD. Epidemiological aspects of and risk factors for wheezing in the first year of life. *J Bras Pneumol*. 2014;40(6):617-25. Epub 2015/01/23.
505. van Merode T, Maas T, Twellaar M, Kester A, van Schayck CP. Gender-specific differences in the prevention of asthma-like symptoms in high-risk infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(3):196-200. Epub 2007/04/17.

506. Ferraz E, Garcia CA, Bettiol H, Caldeira RD, Cardoso VC, Arruda LK, et al. Atopy risk factors at birth and in adulthood. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(4):336-42. Epub 2011/08/16.
507. Osman M, Tagiyeva N, Wassall HJ, Ninan TK, Devenny AM, McNeill G, et al. Changing trends in sex specific prevalence rates for childhood asthma, eczema, and hay fever. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(1):60-5. Epub 2006/11/30.
508. Leermakers ET, Sonnenschein-van der Voort AM, Gaillard R, Hofman A, de Jongste JC, Jaddoe VW, et al. Maternal weight, gestational weight gain and preschool wheezing: the Generation R Study. *Eur Respir J*. 2013;42(5):1234-43. Epub 2013/03/09.
509. Pike KC, Inskip HM, Robinson SM, Cooper C, Godfrey KM, Roberts G, et al. The relationship between maternal adiposity and infant weight gain, and childhood wheeze and atopy. *Thorax*. 2013;68(4):372-9. Epub 2013/01/08.
510. Harpsøe MC, Basit S, Bager P, Wohlfahrt J, Benn CS, Nohr EA, et al. Maternal obesity, gestational weight gain, and risk of asthma and atopic disease in offspring: a study within the Danish National Birth Cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1033-40. Epub 2012/11/06.
511. Smith H. Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1992;22(2):187-97. Epub 1992/02/01.
512. Reinero CR, Brownlee L, Decile KC, Seguin B, Berghaus RD, Nelson RW, et al. Inhaled flunisolide suppresses the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, but has minimal systemic immune effects in healthy cats. *J Vet Intern Med*. 2006;20(1):57-64. Epub 2006/02/25.
513. Fokkens WJ, van de Merwe JP, Braat JP, Overbeek SE, Hooijkaas H. The effect of intranasal and inhaled corticosteroids in healthy volunteers on the number of circulating lymphocytes and lymphocyte subsets. *Allergy*. 1999;54(2):158-64. Epub 1999/04/30.
514. Levy J, Zalkinder I, Kuperman O, Skibin A, Apte R, Bearman JE, et al. Effect of prolonged use of inhaled steroids on the cellular immunity of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(4):806-12. Epub 1995/04/01.
515. Zhang H, Cardell LO, Bjorkander J, Benson M, Wang H. Comprehensive profiling of peripheral immune cells and subsets in patients with intermittent allergic rhinitis compared to healthy controls and after treatment with glucocorticoids. *Inflammation*. 2013;36(4):821-9. Epub 2013/02/16.
516. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):256-62. Epub 1998/01/28.
517. Machura E, Mazur B, Pieni \acute{a} zek W, Karczewska K. Expression of naive/memory (CD45RA/CD45RO) markers by peripheral blood CD4(+) and CD8(+) T cells in children with asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56(1):55-62.
518. Kurashima K, Fujimura M, Myou S, Ishiura Y, Onai N, Matsushima K. Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. *Respirology*. 2006;11(2):152-7.
519. Antunez C, Torres MJ, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Santamaria-Babi LF, et al. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(3):166-74. Epub 2006/05/05.
520. Matsuyama T, Urano K, Ohkido M, Ozawa H, Ohta A, Kaneko S, et al. The quantitative and qualitative defect of CD4+ CD45RO+ memory-type T cells are involved in the abnormality of TH1 immunity in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(5):687-94.
521. Gemou-Enges \acute{a} th V, Fagerhol MK, Toda M, Hamid Q, Halvorsen S, Groegaard JB, et al. Expression of Activation Markers and Cytokine mRNA by Peripheral Blood CD4 and CD8 T Cells in Atopic and Nonatopic Childhood Asthma: Effect of Inhaled Glucocorticoid Therapy. *Pediatrics*. 2002;109(2):e24.
522. Karlsson MG, Davidsson A, Hellquist HB. Increase in CD4+ and CD45RO+ memory T cells in the nasal mucosa of allergic patients. *APMIS*. 1994;102(10):753-8. Epub 1994/10/01.

523. Faint JM, Annels NE, Curnow SJ, Shields P, Pilling D, Hislop AD, et al. Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol.* 2001;167(1):212-20. Epub 2001/06/22.
524. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013;43(11):2797-809. Epub 2013/11/22.
525. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, Leuvenink J, van Hout RWNM, de Vries E. Paediatric Reference Values for the Peripheral T cell Compartment. *Scand J Immunol.* 2012;75(4):436-44.
526. Lee SY, Kim SJ, Kwon SS, Kim YK, Kim KH, Moon HS, et al. Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001;86(6):659-64. Epub 2001/06/29.
527. Lara-Marquez ML, Moan MJ, Cartwright S, Listman J, Israel E, Perkins DL, et al. Atopic asthma: differential activation phenotypes among memory T helper cells. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(8):1232-41.
528. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, McEuen AR, Walls AF, et al. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. *Allergy.* 2004;59(2):204-12. Epub 2004/02/07.
529. Majori M, Piccoli ML, Melej R, Pileggi V, Pesci A. Lymphocyte activation markers in peripheral blood before and after natural exposure to allergen in asthmatic patients. *Respiration.* 1997;64(1):45-9. Epub 1997/01/01.
530. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax.* 1993;48(1):26-32.
531. Botturi K, Lacoëuille Y, Cavaillès A, Vervloet D, Magnan A. Differences in allergen-induced T cell activation between allergic asthma and rhinitis: Role of CD28, ICOS and CTLA-4. *Respir Res.* 2011;12(1):25-.
532. Majori M, Piccoli ML, Bertacco S, Cuomo A, Cantini L, Pesci A. Inhaled beclomethasone dipropionate downregulates CD4 and CD8 T-lymphocyte activation in peripheral blood of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(3):379-82. Epub 1997/10/06.
533. Vatrella A, Perna F, Pelaia G, Parrella R, Maselli R, Marsico SA, et al. T cell activation state in the induced sputum of asthmatics treated with budesonide. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(3):745-53. Epub 2010/10/15.
534. Wilson JW, Djukanovic R, Howarth PH, Holgate ST. Inhaled beclomethasone dipropionate downregulates airway lymphocyte activation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(1):86-90. Epub 1994/01/01.
535. Mahmoud F, Abul H, Omu A, Al-Rayes S, Haines D, Whaley K. Pregnancy-Associated Changes in Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations in Normal Kuwaiti Women. *Gynecol Obstet Invest.* 2001;52(4):232-6.
536. Kühnert M, Schmidt S. Changes in lymphocyte subsets during pregnancy and post-partum in cases of beginning eclampsia. *J Perinat Med* 2000. p. 389.
537. Kawayama T, Matsunaga K, Kaku Y, Yamaguchi K, Kinoshita T, O'Byrne PM, et al. Decreased CTLA4(+) and Foxp3(+) CD25(high)CD4(+) cells in induced sputum from patients with mild atopic asthma. *Allergol Int.* 2013;62(2):203-13. Epub 2013/03/26.
538. Nie W, Chen J, Xiu Q. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(7):e42062. Epub 2012/07/31.
539. Kolar P, Knieke K, Hegel JK, Quandt D, Burmester GR, Hoff H, et al. CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):123-32. Epub 2009/01/01.
540. Pellerin L, Jenks JA, Begin P, Bacchetta R, Nadeau KC. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res.* 2014;58(2-3):358-68. Epub 2014/05/02.
541. Hampe CS. B Cells in Autoimmune Diseases. *Scientifica.* 2012;2012:18.

542. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:681678. Epub 2014/05/31.
543. Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, Randall TD, Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res.* 2009;45(2-3):144-58. Epub 2009/04/08.
544. Kardava L, Moir S, Shah N, Wang W, Wilson R, Buckner CM, et al. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest.* 2014;124(7):3252-62. Epub 2014/06/04.
545. Gheorghiu M, Popescu IG, Rusu G, Chirila M. T and B lymphocytes in respiratory pollen allergies (bronchial pollen asthma and allergic rhinitis). *Med Interne.* 1979;17(1):87-92. Epub 1979/01/01.
546. Azevedo M, Castel-Branco MG, Mendes A, Oliveira JF, Carvalho AS, Almeida J, et al. T and B lymphocytes, total serum IgE and peripheral eosinophils in bronchial asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 1980;8(3):189-96. Epub 1980/05/01.
547. Kaushik A, Sharma IK, Gupta RK, Sadhna, Kumar R. T and B cell status in bronchiolitis and bronchial asthma. *Indian Pediatr.* 1990;27(9):939-44. Epub 1990/09/01.
548. Volovitz B, Shohat B, Amir J, Nussinovitch M, Varsano I. T cells number and function in young asthmatic children during 2 years treatment with inhaled budesonide. *Isr J Med Sci.* 1994;30(8):572-7. Epub 1994/08/01.
549. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1762-73. Epub 2008/06/03.
550. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Pellicano M, Vitello S, Lio D, et al. A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(10):681-90. Epub 2009/08/25.
551. Kaminski DA, Wei C, Rosenberg AF, Lee FE, Sanz I. Multiparameter flow cytometry and bioanalytics for B cell profiling in systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Biol.* 2012;900:109-34. Epub 2012/08/31.
552. Mahmood Z, Muhammad K, Schmalzing M, Roll P, Dorner T, Tony HP. CD27-IgD- memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):61. Epub 2015/04/19.
553. Wong KJ, Timbrell V, Xi Y, Upham JW, Collins AM, Davies JM. IgE+ B cells are scarce, but allergen-specific B cells with a memory phenotype circulate in patients with allergic rhinitis. *Allergy.* 2015;70(4):420-8. Epub 2015/01/06.
554. Lundell AC, Hesselmar B, Nordstrom I, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher B-cell activating factor levels at birth are positively associated with maternal dairy farm exposure and negatively related to allergy development. *J Allergy Clin Immunol.* 2015. Epub 2015/05/06.
555. Finke D, Baribaud F, Diggelmann H, Acha-Orbea H. Extrafollicular plasmablast B cells play a key role in carrying retroviral infection to peripheral organs. *J Immunol.* 2001;166(10):6266-75. Epub 2001/05/09.
556. Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, Zhang Y, Niesner R, Hauser AE. Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytometry A.* 2014;85(1):15-24. Epub 2014/04/05.
557. Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, et al. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clin Exp Immunol.* 2002;130(3):370-8. Epub 2002/11/28.
558. Fedele AL, Tolusso B, Gremese E, Bosello SL, Carbonella A, Canestri S, et al. Memory B cell subsets and plasmablasts are lower in early than in long-standing rheumatoid arthritis. *BMC Immunol.* 2014;15:28. Epub 2014/09/05.
559. Schuster M, Tschernig T, Krug N, Pabst R. Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown Norway rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(2 Pt 1):558-66. Epub 2000/02/15.

560. Kantele JM, Savilahti E, Westerholm-Ormio M, Pakkanen S, Arvilommi HS, Reunala T, et al. Decreased numbers of circulating plasmablasts and differences in IgA1-plasmablast homing to skin in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(3):535-41. Epub 2009/05/15.
561. Gomez-Lopez N, Tanaka S, Zaeem Z, Metz GA, Olson DM. Maternal circulating leukocytes display early chemotactic responsiveness during late gestation. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013;13 Suppl 1:S8. Epub 2013/03/06.
562. Medina KL, Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(12):5382-6. Epub 1994/06/07.
563. Medina KL, Strasser A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood.* 2000;95(6):2059-67. Epub 2000/03/09.
564. Kincade PW. B lymphopoiesis: global factors, local control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):2888-9. Epub 1994/04/12.
565. Bosco N, Ceredig R, Rolink A. Transient decrease in interleukin-7 availability arrests B lymphopoiesis during pregnancy. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):381-90. Epub 2008/01/19.
566. Zhang L, Chang KK, Li MQ, Li DJ, Yao XY. Mouse endometrial stromal cells and progesterone inhibit the activation and regulate the differentiation and antibody secretion of mouse B cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(1):123-33. Epub 2014/01/16.
567. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167(3):1245-53. Epub 2001/07/24.
568. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, et al. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol.* 2008;129(3):401-12. Epub 2008/09/23.
569. Loewendorf AI, Nguyen TA, Yesayan MN, Kahn DA. Normal human pregnancy results in maternal immune activation in the periphery and at the uteroplacental interface. *PLoS One.* 2014;9(5):e96723. Epub 2014/05/23.
570. Wegienka G, Havstad S, Bobbitt KR, Woodcroft KJ, Zoratti EM, Ownby DR, et al. Within-woman change in regulatory T cells from pregnancy to the postpartum period. *J Reprod Immunol.* 2011;88(1):58-65. Epub 2010/10/22.
571. Yuksek M, Erol F, Guloglu D, Dogu F, Elhan AH, Babacan E, et al. Regulatory T cell levels in children with asthma. *Turk J Pediatr.* 2011;53(5):532-6. Epub 2012/01/26.
572. Singh AM, Dahlberg P, Burmeister K, Evans MD, Gangnon R, Roberg KA, et al. Inhaled corticosteroid use is associated with increased circulating T regulatory cells in children with asthma. *Clin Mol Allergy.* 2013;11(1):1. Epub 2013/01/26.
573. Areia A, Vale-Pereira S, Alves V, Rodrigues-Santos P, Moura P, Mota-Pinto A. Membrane progesterone receptors in human regulatory T cells: a reality in pregnancy. *BJOG.* 2015. Epub 2015/02/03.
574. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology.* 2006;118(1):58-65. Epub 2006/04/25.
575. Mjosberg J, Svensson J, Johansson E, Hellstrom L, Casas R, Jenmalm MC, et al. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *J Immunol.* 2009;183(1):759-69. Epub 2009/06/19.
576. Thorburn AN, Hansbro PM. Harnessing regulatory T cells to suppress asthma: from potential to therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(5):511-9. Epub 2010/01/26.
577. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23. Epub 2013/02/22.
578. Ledesma-Soto Y, Blanco-Favela F, Fuentes-Panana EM, Tesoro-Cruz E, Hernandez-Gonzalez R, Arriaga-Pizano L, et al. Increased levels of prolactin receptor expression correlate

with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment. *BMC Immunol.* 2012;13:11. Epub 2012/03/13.

579. Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, et al. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med Wkly.* 2010;140(13-14):187-201. Epub 2010/02/23.

580. Murphy VE, Clifton VL, Gibson PG. Asthma exacerbations during pregnancy: incidence and association with adverse pregnancy outcomes. *Thorax.* 2006;61(2):169-76. Epub 2006/01/31.

581. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol.* 2000;164(11):5721-8. Epub 2000/05/23.

582. Amoudruz P, Minang JT, Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Troye-Blomberg M, et al. Pregnancy, but not the allergic status, influences spontaneous and induced interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, IL-10 and IL-12 responses. *Immunology.* 2006;119(1):18-26. Epub 2006/06/13.

583. Vanders RL, Gibson PG, Wark PA, Murphy VE. Alterations in inflammatory, antiviral and regulatory cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells from pregnant women with asthma. *Respirology.* 2013;18(5):827-33. Epub 2013/02/21.

584. Prokesova L, Lodinova-Zadnikova R, Zizka J, Kocourkova I, Novotna O, Petraskova P, et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17(3):175-83. Epub 2006/05/05.

585. Rutz S, Ouyang W. Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):605-12. Epub 2011/08/25.

586. Stelmach I, Gorski P, Jerzynska J, Stelmach W, Majak P, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with formoterol on clinical and inflammatory parameters of asthma in children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;89(1):67-73. Epub 2002/07/27.

587. Marzi M, Vigano A, Trabattini D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):127-33. Epub 1996/10/01.

588. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(3):933-8. Epub 1998/05/20.

589. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(3):550-5. Epub 1999/09/01.

590. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Ponnampalam S, Teoh TG, Bennett PR. Changes in the Th1:Th2 cytokine bias in pregnancy and the effects of the anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:416739. Epub 2012/06/13.

591. Keski-Nisula L, Hirvonen MR, Roponen M, Heinonen S, Pekkanen J. Maternal and neonatal IL-4 and IFN-gamma production at delivery and 3 months after birth. *J Reprod Immunol.* 2003;60(1):25-33. Epub 2003/10/22.

592. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 1999;283(5406):1277-8. Epub 1999/03/20.

593. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012;62(3):263-71. Epub 2012/03/13.

594. Rastogi D, Wang C, Lendor C, Rothman PB, Miller RL. T-helper type 2 polarization among asthmatics during and following pregnancy. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(7):892-8. Epub 2006/07/15.

595. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002;168(7):3195-204. Epub 2002/03/22.

596. Hinks TS, Zhou X, Staples KJ, Dimitrov BD, Manta A, Petrossian T, et al. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):323-33. Epub 2015/03/10.
597. Tsvetkova-Vicheva VM, Gecheva SP, Komsa-Penkova R, Velkova AS, Lukanov TH. IL-17 producing T cells correlate with polysensitization but not with bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):3. Epub 2014/01/17.
598. Albano GD, Di Sano C, Bonanno A, Riccobono L, Gagliardo R, Chanez P, et al. Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach. *PLoS One*. 2013;8(4):e58892. Epub 2013/04/11.
599. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi E, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1849-61. Epub 2007/07/20.
600. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011;66(8):989-98. Epub 2011/03/08.
601. Hong S, Son DK, Lim WR, Kim SH, Kim H, Yum HY, et al. The prevalence of atopic dermatitis, asthma, and allergic rhinitis and the comorbidity of allergic diseases in children. *Environ Health Toxicol*. 2012;27:e2012006. Epub 2012/02/24.
602. O'Connell EJ. The burden of atopy and asthma in children. *Allergy*. 2004;59 Suppl 78:7-11. Epub 2004/07/13.
603. Beasley R, Semprini A, Mitchell EA. Risk factors for asthma: is prevention possible? *Lancet*. 2015;386(9998):1075-85. Epub 2015/09/19.
604. Guibas GV, Megremis S, West P, Papadopoulos NG. Contributing factors to the development of childhood asthma: working toward risk minimization. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(6):721-35. Epub 2015/04/16.
605. Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15 Suppl 16:4-5, 9-32. Epub 2004/05/06.
606. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(9):975-81. Epub 2006/08/19.
607. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(7):722-7. Epub 2005/01/20.
608. Li YF, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest*. 2005;127(4):1232-41. Epub 2005/04/12.
609. Illi S, Weber J, Zutavern A, Genuneit J, Schierl R, Strunz-Lehner C, et al. Perinatal influences on the development of asthma and atopy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112(2):132-9 e1. Epub 2014/01/29.
610. de Vries E, van Tol MJ, van den Bergh RL, Waaijer JL, ten Dam MM, Hermans J, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(3):267-75. Epub 2000/02/16.
611. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127(1):14-25. Epub 2008/01/15.
612. Lundell AC, Hesselmar B, Nordstrom I, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher B-cell activating factor levels at birth are positively associated with maternal dairy farm exposure and negatively related to allergy development. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):1074-82 e3. Epub 2015/05/06.
613. Lundell AC, Johansen S, Adlerberth I, Wold AE, Hesselmar B, Rudin A. High proportion of CD5+ B cells in infants predicts development of allergic disease. *J Immunol*. 2014;193(2):510-8. Epub 2014/06/15.